

TESIS DE DOCTORADO

**NEUROPROTECCIÓN CON  
HIPOTERMIA Y ALOPURINOL EN EL  
DAÑO HIPÓXICO-ISQUÉMICO.  
PAPEL DEL EFECTO ANTIOXIDANTE.**

Cristina Durán Fernández-Feijóo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019



## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

**Neuroprotección con hipotermia y alopurinol en el daño hipóxico-  
isquémico. Papel del efecto antioxidante.**

Dña. Cristina Durán Fernández-Feijóo

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 1 de Mayo de 2019*

Fdo. Cristina Durán Fernández-Feijóo







## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**Neuroprotección con hipotermia y alopurinol en el daño hipóxico-  
isquémico. Papel del efecto antioxidante.**

D. José Ramón Fernández Lorenzo

Dña. Marta Camprubí Camprubí

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Cristina Durán Fernández-Feijóo, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 1 de Mayo de 2019*

Fdo. D. José Ramón Fernández Lorenzo

Fdo. Dña. Marta Camprubí Camprubí



## AGRADECIMIENTOS

---





*A mis padres*  
*A mis hermanas*  
*A Sofia, a Elisa*  
*A Andrea*





## **FINANCIACIÓN**

---

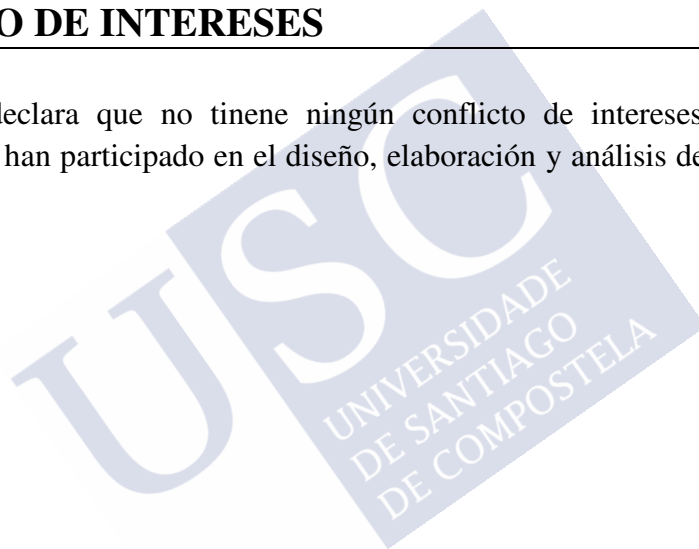
Este estudio ha recibido financiación de la Beca Sen-Alter para proyectos de investigación: Neuroprotección con hipotermia y alopurinol en el daño cerebral hipóxico-isquémico desde 2013.

En el 2013 recibí la beca: “Ayuda para estancias formativas 2013” de la Sociedad Española de Neonatología que me ha permitido la estancia en el Laboratorio del Sant Joan de Déu (Barcelona) en dicho año.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

---

La autora declara que no tiene ningún conflicto de intereses y que las entidades financiadoras no han participado en el diseño, elaboración y análisis de los resultados de este trabajo.







## RESUMEN

---

La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) en el recién nacido a término o casi a término constituye una importante causa de morbilidad neonatal y discapacidad permanente. El tratamiento con hipotermia moderada todavía no ofrece unos resultados plenamente satisfactorios por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas terapias coadyuvantes. Uno de los mecanismos principales causantes del daño cerebral hipóxico-isquémico es el estrés oxidativo. El alopurinol, inhibidor de la xantina oxidasa, se le atribuye un efecto inhibidor de la formación de los radicales libres.

El objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar si la administración postnatal del alopurinol, en combinación con la hipotermia, reduce el estrés oxidativo en un modelo animal de EHI. Para ello se han utilizado crías de rata procedentes de 10 parejas de ratas Wistar adultas (Harlan Ibérica) del día postnatal 10, equivalentes a la edad de a término, que fueron sometidas a un evento hipóxico-isquémico (modelo de Rice-Vannucci) y aleatorizadas en 5 grupos: control “sham-operated” (C), hipóxico-isquémico (HI), hipóxico-isquémico hipotermia (HIH), hipóxico-isquémico alopurinol (HIA), hipóxico-isquémico hipotermia y alopurinol (HIHA). Los animales fueron sacrificados a las 72 horas del evento hipóxico-isquémico y se estudiaron los siguientes marcadores de estrés oxidativo: sistemas antioxidantes en sangre (FRAP, ABTS, GSH y GSH/GSSG), capacidad antioxidante total en el líquido cefalorraquídeo (FRAP), oxidación proteica (grupos carbonilo) en sangre y peroxidación lipídica (F2-isoprostanos) en tejido cerebral.

En este estudio se ha detectado una disminución significativa de los sistemas antioxidantes en sangre y en líquido cefalorraquídeo en el grupo hipóxico-isquémico (HI), objetivando una normalización de los sistemas antioxidantes en sangre en los grupos que recibieron tratamiento neuroprotector (HIA, HIH, HIHA) ( $p < 0.05$ ), especialmente en el grupo combinado (HIHA). Con respecto al estudio de la capacidad antioxidante total en el líquido cefalorraquídeo, el grupo alopurinol (HIA) ha sido el único con una normalización de sus niveles. Los grupos carbonilo y los F2-isoprostanos se encuentran significativamente elevados en el grupo HI, decreciendo la oxidación proteica en todos los grupos que reciben tratamiento (HIA, HIH, HIHA) y la peroxidación lipídica en los grupos hipotermia y tratamiento combinado (HIH, HIHA) ( $p < 0.05$ ).

Nuestro trabajo refuerza la idea de que el cerebro neonatal es muy vulnerable al estrés oxidativo tras un evento HI. La hipotermia y la terapia combinada hipotermia y alopurinol, ofrecen protección frente al daño oxidativo traducéndose en un mejor mantenimiento de los niveles de antioxidantes, así como en una menor oxidación proteica y lipídica. A raíz de los resultados obtenidos y en concordancia con otras publicaciones, creemos que la hipotermia ofrece un papel estabilizador de la barrera hematoencefálica y por tanto la administración del alopurinol debe efectuarse de forma muy precoz para optimizar su papel como antioxidante en el líquido cefalorraquídeo cuando se administra de forma conjunta con la hipotermia (HIHA).

**Palabras clave:** encefalopatía hipóxico-isquémica, estrés oxidativo, neuroprotección, alopurinol, hipotermia.

## ABSTRACT

---

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is an important cause of death and long-term morbidity despite hypothermia treatment. Oxidative stress is one of main mechanisms involved in hypoxic-ischemic brain damage. Xanthine-oxidase inhibitor, allopurinol, can potentially reduce the formation of free radicals. The aim of this project was to investigate whether postnatal allopurinol administration in combination with hypothermia would reduce oxidative stress in an animal model of HIE.

Postnatal 10-day Wistar (Harlam Ibérica) rat pups, term-equivalent, were subjected to hypoxic-ischemic event (Rice-Vannucci model) and randomized into five groups: sham-operated (C), hypoxic-ischemic no treatment (HI), hypoxic-ischemic hypothermia (HIH), hypoxic-ischemic allopurinol (HIA) and hypoxic-ischemic dual therapy (hypothermia and allopurinol) (HIHA).

To evaluate treatment's neuroprotective efficiency, 72 hours after the hypoxic-ischemic event, animals were sacrificed and blood antioxidant systems (ABTS, FRAP, GSH, GSH/GSSG), cerebrospinal fluid (CSF) antioxidant capacity (FRAP), blood protein oxidation (carbonyl groups) and lipid peroxidation (F2-isoprostanes) brain tissue were measured.

HI group presented the lowest levels of antioxidant in plasma and FRAP in CSF ( $p < 0.05$ ). An increase of the antioxidant systems was observed in all treatment groups (HIH, HIA, HIHA) ( $p < 0.05$ ), especially in the dual therapy (HIHA). Only alopurinol group (HIA) recovered antioxidant capacity levels in CSF ( $p < 0.05$ ). Determination of carbonyl groups in plasma and F2-isoprostanes in brain tissue was higher in the HI group ( $p < 0.05$ ). Protein oxidation was decreased in all treatment groups (HIA, HIH, HIHA) ( $p < 0.05$ ). Hypothermia and dual therapy significantly decreased lipid peroxidation.

Antioxidant capacity is affected after a hypoxic-ischemic event with an increase in oxidative damage. Combined therapy, as well as hypothermia, is effective reducing oxidative injury. Allopurinol raises antioxidant levels providing a potential neuroprotective strategy. An earlier allopurinol administration may improve CSF antioxidant levels when combined treatment is applied.

**Keywords:** Hypoxic-ischemic encephalopathy, oxidative stress, neuroprotection, allopurinol, hypothermia.

## ABREVIATURAS

---

AIF: factor de inducción de apoptosis.  
AMPA: alfa- amino-3 hidroxy-5-methyl-4-isoxazol propionic acid.  
BHE: barrera hematoencefálica.  
C: control.  
CRM: cadena de respiración mitocondrial.  
EHI: encefalopatía hipóxico-isquémica.  
EPO: eritropoyetina.  
F2-IsoPs: F2-isoprostanos.  
GSH: glutatión.  
GSH/GSSG: glutatión reducido/glutatión oxidado.  
GC: grupos carbonilo.  
GPX: glutatión peroxidasa.  
HI: hipóxico-isquémico  
HIA: hipóxico-isquémico alopurinol.  
HIH: hipóxico-isquémico hipotermia.  
HIHA: hipóxico-isquémico hipotermia alopurinol.  
H2O2: peróxido de hidrógeno.  
LCR: líquido cefalorraquídeo.  
LPV: leucomalacia periventricular.  
NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato.  
NBPI: hierro libre no unido a proteínas, “non-bound protein iron”.  
NMDA: N-metil-D-aspartato.  
NOS: óxido nítrico sintasa.  
NOSe: óxido nítrico sintasa endotelial.  
NOSi: óxido nítrico sintasa inducible.  
NOSn: óxido nítrico sintasa neuronal.  
•NO: óxido nítrico.  
ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito.  
•OH: radical hidroxilo.  
•O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superóxido.  
SOD: superóxido dismutasa.  
RM: resonancia magnética  
RNS: especies reactivas de nitrógeno, “reactive nitrogen species”.  
ROS: especies reactivas de oxígeno, “reactive oxygen species”.  
TAC: capacidad antioxidante total. “total antioxidant capacity”  
XO: xantina oxidasa.  
XOR: xantina oxidasa reductasa.  
XDH: xantina deshidrogenasa.



# ÍNDICE

---

<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1. Epidemiología .....	3
1.2. Definición y cuadro clínico .....	3
1.3. Modelo experimental de encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal: modelo en cría de rata .....	5
1.4. Fisiopatogenia del daño cerebral hipóxico-isquémico .....	6
1.4.1. Fases del daño cerebral.....	7
1.4.1.1. Fase primaria .....	7
1.4.1.2. Fase latente y/o periodo ventana .....	7
1.4.1.3. Fase secundaria.....	8
1.4.1.4. Fase terciaria.....	8
1.4.2. Mecanismos implicados en el daño cerebral hipóxico-isquémico .....	9
1.4.2.1. Excitotoxicidad.....	9
1.4.2.2. Estrés oxidativo .....	11
1.4.2.3. Inflamación.....	11
1.4.2.4. Muerte celular.....	11
1.5. Estrés oxidativo en la encefalopatía hipóxico-isquémica.....	13
1.5.1. Especies reactivas de oxígeno y radicales libres .....	13
1.5.2. Sistemas antioxidantes .....	14
1.5.3. Estrés oxidativo y excitotoxicidad.....	16
1.5.4. Daño hipóxico-isquémico y estrés oxidativo .....	16
1.5.5. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	17
1.6. Estrategias de neuroprotección en la encefalopatía hipóxico-isquémica .....	18
1.6.1. Hipotermia.....	18
1.6.2. Alopurinol .....	20
1.6.2.1. Alopurinol como fármaco antioxidante.....	20
1.6.2.2. Xantina-oxido-reductasa y ROS/RNS.....	21
1.6.2.3. Alopurinol como fármaco neuroprotector: estudios experimentales.....	22
1.6.2.4. Alopurinol como fármaco neuroprotector: estudios en humanos.....	22
1.6.3. Otras terapias coadyuvantes .....	24
1.6.3.1. Eritropoyetina .....	24
1.6.3.2. Melatonina.....	24
1.6.3.3. Topiramato .....	25
1.6.3.4. Xenon .....	25
1.6.3.5. Cannabidiol .....	26
1.6.3.6. Terapia con células madre.....	26
<b>2. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>29</b>
2.1. Hipótesis.....	29

2.2. Objetivos .....	29
<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>33</b>
3.1. Animales y estabularización.....	33
3.2. Diseño experimental.....	33
3.2.1. Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica.....	33
3.2.2. Tratamiento con hipotermia .....	35
3.2.3. Tratamiento con alopurinol .....	36
3.2.4. Grupos de estudio .....	36
3.2.5. Obtención y procesamiento de las muestras.....	37
3.3. Estudio del estrés oxidativo.....	38
3.3.1. Estudio en plasma/líquido cefalorraquídeo de la capacidad antioxidante total..	39
3.3.2. Estudio en plasma de los niveles del antioxidante GSH y el cociente GSH/GSSG .....	39
3.3.3. Estudio en plasma de los niveles de grupos carbonilo .....	40
3.3.4. Estudio en tejido cerebral de los niveles de F2-isoprostanos .....	40
3.4. Análisis estadístico .....	41
3.4.1. Capacidad antioxidante total .....	41
3.4.2. GSH y cociente GSH/GSSG .....	41
3.4.3. Grupos carbonilo .....	42
3.4.4. F2-isoprostanos (8-isoprostano) .....	42
<b>4. Resultados .....</b>	<b>45</b>
4.1. Estudio antioxidante en sangre .....	45
4.1.1. Capacidad antioxidante total .....	45
4.1.1.1. Método FRAP.....	45
4.1.1.2. Método ABTS .....	47
4.1.2. Niveles de GSH .....	48
4.1.3. Cociente GSH/GSSG .....	50
4.2. Estudio antioxidante en líquido cefalorraquídeo.....	51
4.3. Daño oxidativo a proteínas en sangre: grupos carbonilo .....	53
4.4. Daño oxidativo a lípidos en tejido cerebral.....	54
4.4.1. Niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF2 $\alpha$ ) en hipocampo .....	54
4.4.2. Niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF2 $\alpha$ ) en córtex .....	56
<b>5. Discusión.....</b>	<b>61</b>
5.1. Discusión del método .....	61
5.1.1. Modelo de daño hipóxico-isquémico en cría de rata.....	61
5.1.1.1. Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica de Rice-Vannucci .....	62
5.1.1.2. Daño hipóxico-isquémico: técnica quirúrgica.....	63

5.1.1.3. Daño hipóxico-isquémico: tiempos de hipoxia, temperatura y edad del animal .....	64
5.1.2. Edad gestacional en el modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica.....	65
5.1.3. Hipotermia en modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica .....	66
5.1.3.1. Grado de enfriamiento .....	66
5.1.3.2. Tiempo de inicio de la hipotermia.....	67
5.1.4. Alopurinol como agente neuroprotector en la encefalopatía hipóxico-isquémica.....	68
5.1.5. Métodos de evaluación del estrés oxidativo.....	69
5.1.5.1. Métodos para medir la capacidad antioxidante total .....	69
5.1.5.2. Cuantificación de los niveles de GSH y cociente GSH/GSSG .....	70
5.1.5.3. Determinación de los grupos carbonilo.....	71
5.1.5.4. Determinación de isoprostanos .....	71
5.2. Discusión de resultados .....	72
5.2.1. Sistemas antioxidantes: evaluación tras un evento hipóxico-isquémico y efecto de las terapias neuroprotectoras .....	73
5.2.1.1. Capacidad antioxidante total .....	74
5.2.1.2. GSH y cociente GSH/GSSG .....	77
5.2.2. Evaluación del daño oxidativo a proteínas tras un evento hipóxico-isquémico y valoración del efecto de las terapias neuroprotectoras.....	78
5.2.3. Evaluación del daño oxidativo a lípidos tras un evento hipóxico-isquémico y valoración del efecto de las terapias neuroprotectoras.....	80
5.3. Diferencias de género y terapias neuroprotectoras.....	82
5.4. Limitaciones de este estudio.....	83
5.5. Aportaciones de este estudio .....	83
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>87</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>91</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>121</b>







# 1

## Introducción

---



# 1 INTRODUCCIÓN

## ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA

### 1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) perinatal constituye una de las mayores causas de morbi-mortalidad en el periodo neonatal, así como de discapacidad a largo plazo (1–3). Entre un 15-20% de los niños afectados muere en el periodo neonatal y un 25% desarrollarán secuelas neurológicas tales como déficits visuales, convulsiones, parálisis cerebral y retraso psicomotor (2,4).

Su incidencia en países desarrollados se encuentra entre 1-3 casos/1000 recién nacidos vivos a término, aumentando esta cifra hasta 26 casos/1000 en los países subdesarrollados (5).

Se trata de una entidad que tiene consecuencias devastadoras en las familias y en la sociedad, ya que actualmente, a pesar del uso terapéutico de la hipotermia, todavía un 47% de los niños tratados siguen presentando riesgo de muerte o de discapacidad grave (6).

### 1.2 DEFINICIÓN Y CUADRO CLÍNICO

La EHI se define como un síndrome clínico que aparece tras el parto y que engloba una serie de características en mayor o menor grado como son: un deterioro en el nivel de conciencia, alteraciones en el tono muscular y en las respuestas motoras, alteraciones en los reflejos con o sin convulsiones (7). Se trata de un cuadro clínico en el que se evidencia una causa hipóxico-isquémica (HI) perinatal. Acontecimientos agudos que ocurren alrededor del parto tales como el desprendimiento prematuro de la placenta, la ruptura uterina, el prolapso de cordón, el embolismo de líquido amniótico, la transfusión feto materna, nos ponen en aviso de la existencia de una situación de riesgo pero sin ello ser sinónimo de EHI al nacimiento (8,9).

En la práctica clínica, se considera que un recién nacido tiene una EHI cuando presenta una disfunción neurológica global, no focal, asociada o no a una disfunción multiorgánica, además de una acidosis metabólica (pH menor o igual a 7 o un déficit de bases de al menos 12 mmol/L en cuero cabelludo fetal, cordón umbilical o en sangre durante la primera hora de vida) y/o un Apgar menor a 5 a los 5 minutos de vida (10). Así mismo, debe de existir al menos un antecedente obstétrico que señale la existencia de riesgo de HI fetal (9).

Desde el punto de vista neuropatológico se describen fundamentalmente dos patrones de lesión en el recién nacido a término con EHI: un patrón con afectación de los ganglios de la base/tálamos y del córtex perirrolándico, donde puede existir en los casos más severos una

extensión a todo el córtex y al tronco del encéfalo. El otro patrón se relaciona con eventos subagudos y mantenidos y corresponde a zonas con vascularización limítrofe, afectando predominantemente a la sustancia blanca especialmente la región parasagital, con extensión a la sustancia gris cortical cuando el daño es severo (Ver figura 1). No es infrecuente que ambos patrones coexistan en proporción variable (11,12). Parece que el patrón de daño que presenta el recién nacido es más predictivo del pronóstico neurológico que la severidad de las lesiones (13). Aquellos niños con patrón de lesión de los ganglios de la base/tálamo tienen con mayor frecuencia una afectación más severa a nivel motor, desarrollando parálisis cerebral y epilepsia, mientras que predomina la afectación cognitiva en los niños con patrón de zona vascular limítrofe (sustancia blanca y córtex) (14).

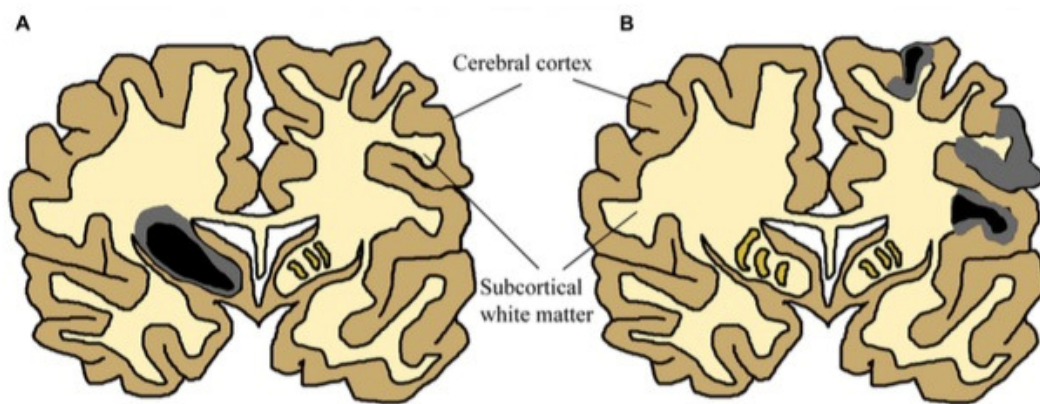


Figura 1. Dibujo simplificado de los 2 patrones mayores de lesión en la EHI. Estos patrones se pueden superponer en algunos pacientes. A. Patrón de lesión ganglios de la base/tálamo. B. Patrón de lesión en zonas de vascularización limítrofe “watershed”. Imagen extraída de Millar LJ y colaboradores (14). Licencia Creative Commons.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de evaluar el grado de afectación tras un episodio de HI es el sexo del recién nacido ya que en función de éste existe una respuesta diferente al daño HI, siendo el varón más vulnerable tanto a sufrir un evento HI, como a presentar un mayor riesgo de afectación en comparación con el sexo femenino (15). Existe por lo tanto un dimorfismo sexual en relación a la HI neonatal, confirmado también en estudios experimentales (16). A pesar de que se conocen algunos mecanismos responsables de la existencia de diferencias histológicas y de pronóstico entre ambos sexos, una de las principales causas que se han apuntado recientemente es la diferencia en la vía predominante de muerte celular o en la respuesta inflamatoria tras un evento HI. A pesar de ello, todavía existen muchas incógnitas entorno a este campo de la investigación (14,17).

### 1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA NEONATAL: MODELO EN CRÍA DE RATA

Los modelos animales de EHI han permitido entender muchos de los mecanismos fisiopatológicos de esta entidad, conocer la evolución del daño y estudiar posibles estrategias terapéuticas. A pesar de su gran utilidad, como es lógico, debemos ser cautelosos en la extrapolación de los resultados a los humanos dada la heterogeneidad de los diferentes modelos de EHI neonatal (18), así como las obvias diferencias inter-especie que existen (19).

El modelo de EHI neonatal más utilizado en la literatura es el modelo en cría de rata, adaptado por Rice-Vannucci y colaboradores en los años 80 (20,21) del modelo Levine de ratas adultas (22). En él, ratas en su día siete postnatal (p7) son sometidas a una ligadura unilateral de la carótida, seguida de un período de exposición a ambiente hipóxico, generalmente al 8%, durante 2-3.5 horas a 37°C. Desde el punto de vista histopatológico, con este modelo se consigue la aparición de edema cerebral que se mantiene durante días, llegando a un nivel máximo a las 72 horas. El grado de lesión se correlaciona con la duración y severidad del evento. En el estudio de Rice-Vannucci obtuvieron un efecto en el hemisferio unilateral de la ligadura, presentándose los primeros cambios histológicos a los 60 minutos del evento HI y progresando hacia el infarto a los 90 minutos. Las principales estructuras afectadas fueron córtex, estriado, tálamo, sustancia blanca subcortical y periventricular e hipocampo ipsilateral, en la mayoría de los animales (90%). Con este modelo la severidad de la lesión aumenta a mayor tiempo de hipoxia (23) estratificándose el daño en moderado-severo. Es conveniente destacar que para obtener un modelo adecuado de EHI son necesarias las dos condiciones: la hipoxia y la isquemia (24).

Otro punto importante a la hora de utilizar un modelo experimental de EHI, es conocer las diferencias que existen en el desarrollo cerebral con respecto a la especie humana con el objetivo de realizar una correcta interpretación de los hallazgos obtenidos y su posible correlación con los recién nacidos.

Si realizamos la comparación con el roedor, el desarrollo del sistema nervioso central se produce en cuestión de días, mientras que en el humano este proceso abarca de semanas a años (18,25). Se detallan a continuación algunas de estas diferencias en el neurodesarrollo:

- Proliferación y migración neuronal: en el humano se produce entre la 4ª y 24ª semanas de gestación, mientras que en el roedor este proceso se completa (con el sistema neocortical, límbico e hipocampo) a los 15 días de vida (p15).
- Sinaptogénesis: en humanos se desarrolla desde el periodo prenatal hasta el 1º-2º año de vida, alcanzando la madurez en la adolescencia. Sin embargo, en los roedores ésta se completa en las primeras 3 semanas tras el nacimiento.

En el sistema nervioso central de la rata y del ratón se ha observado que existe un incremento de la demanda metabólica entre el p7-p21, acompañado de un aumento en la densidad y en la actividad de la mitocondria.

- Mielinización: en los humanos se inicia en la mitad de la gestación y continúa durante años hasta la adolescencia, mientras que en roedores este proceso se inicia en los 2 primeros días de vida y se prolonga más allá del destete (entorno al p28).

Tal y cómo se describe en la revisión realizada por Yager y colaboradores, a lo largo de los años se han ido desarrollado diversas modificaciones en torno al modelo de Rice-Vannucci (26). Algún ejemplo de éstas son las descritas por Renolleau (27), Derugin (28) y Ashwak (29) donde utilizan un modelo de daño HI unilateral transitorio, evidenciándose una respuesta inflamatoria más contundente y en menor tiempo, dando lugar a un aumento en la extensión del daño. Schwarz utilizó un modelo de isquemia bilateral ligando ambas carótidas, en él, se reproducía un infarto más uniforme y severo pero aunque sin describir la mortalidad más allá de las 72 horas del evento (30). En relación al tiempo de hipoxia, éste se ha ido modificando en función del grado de lesión deseable en cada estudio (31).

El modelo de roedor tiene como ventajas su bajo coste y sencillez, a ello se le suma que se trata de un modelo ampliamente utilizado y estudiado, por lo que se posee abundante información sobre los mecanismos bioquímicos del daño cerebral perinatal en estos animales. Sin embargo, tiene como contrapartida importante su limitación para monitorizar variables fisiológicas (23) además de las diferencias ya comentadas con respecto a la maduración cerebral de los niños recién nacidos (32). Desde la descripción de este modelo de EHI neonatal se han incorporado modificaciones para minimizar la variabilidad inter-animal como son el control del tamaño de la camada, la reducción del tiempo de anestesia y el precalentamiento pre-hipoxia (33).

La aparición de modelos animales de mayor tamaño con un sistema nervioso central más complejo, como el cerdo (34–36) la oveja (37) o el cordero (38), han permitido una mejor monitorización tanto hemodinámica como de actividad cerebral, con la posibilidad de cateterizar accesos vasculares, así como de monitorizar la actividad cerebral mediante el uso de electroencefalografía integrada de amplitud (aEEG). La principal limitación en la utilización de estos animales, a parte de su coste elevado y su gran tamaño, es la dificultad para realizar estudios sobre las repercusiones a largo plazo.

Inicialmente, la mayoría de los estudios evaluaban el daño no más allá de las primeras 24 horas, pero con el tiempo se ha hecho patente la necesidad de desarrollar modelos que analicen la evolución cognitiva y motora para así poder evaluar las secuelas tardías y testar posibles estrategias terapéuticas en modelos de EHI bien consolidados, como paso previo a la aplicación en humanos. Aquí el modelo de animal pequeño tiene como ventajas su tamaño y su supervivencia a largo plazo, facilitando la realización de evaluaciones cognitivas.

#### **1.4 FISIOPATOGENIA DEL DAÑO CEREBRAL HIPÓXICO-ISQUÉMICO**

La patogénesis del daño cerebral perinatal es compleja, interviniendo múltiples vías y mecanismos fisiopatogénicos. Conocer bien estos mecanismos es fundamental para intentar prevenir este daño y buscar terapias neuroprotectoras (39) y es en este punto donde los modelos animales nos han sido de gran utilidad (20,35,37).

### 1.4.1 Fases del daño cerebral

El daño cerebral se inicia en el momento de la agresión HI y continúa durante el periodo de recuperación. Estudios publicados demuestran que el proceso de muerte celular en el cerebro expuesto a un evento HI comienza inmediatamente y se prolonga durante un periodo que va de días a semanas. La duración de la apoptosis y necrosis celular depende de la región y la severidad del daño (40,41). A nivel molecular este proceso se puede dividir en varias fases. (Ver figura 2).

#### 1.4.1.1 Fase primaria

De forma inmediata tras la agresión HI, tiene lugar una despolarización celular y un fracaso energético primario. En esta fase se produce la muerte de las primeras neuronas, aquellas que no recuperaremos a pesar de tratamientos neuroprotectores.

Uno de los mecanismos claves que ocurre durante el periodo de hipoxia es la pérdida de la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral (FSC) (42). Dicho mecanismo en condiciones fisiológicas permite mantener estable la velocidad del FSC independientemente de los cambios de la presión arterial sistémica.

Cuando el flujo cerebral se ve interrumpido, se produce un periodo de hipoxia y como consecuencia un aumento de la PaCO<sub>2</sub> y acidosis. Ambos factores inducen a una vasoparálisis que, sumado a la hipotensión, dará lugar a una isquemia cerebral (43). Todo ello se traduce en menos aportes de oxígeno y de nutrientes, dañando así las células gliales y neuronales.

El cerebro inmaduro se caracteriza por tener una baja capacidad para transportar glucosa a través de la barrera hematoencefálica por eso, cuando disminuye el FSC los niveles de glucosa caen rápidamente y iniciándose lo que se conoce como fallo energético primario.

En esta fase la ausencia de oxígeno y glucosa en el cerebro conlleva a una glicolisis anaerobia con un aumento de ácido láctico y una disminución de fosfatos de alta energía (ATP y fosfocreatina) (44,45). Esta depleción de ATP produce una disminución del transporte transcelular y un posterior acúmulo de calcio, sodio y agua en el interior de la célula produciendo la despolarización de la membrana celular. Esta despolarización da lugar a una liberación de neurotransmisores excitatorios que activan la llamada cascada excitotóxica-oxidativa (46). La entrada masiva de calcio en el interior de la célula produce la activación de las lipasas, de la NO-sintasa, la producción de radicales libres y la interrupción de la respiración mitocondrial con la consecuente activación de las vías de apoptosis-necrosis que finalizarán en la muerte celular (43,47).

#### 1.4.1.2 Fase latente y/o periodo ventana

Si después del evento hipóxico se restaura la perfusión cerebral, empieza una recuperación parcial del metabolismo oxidativo del cerebro. Extrapolándose de algunos trabajos en animales, se cree que esta fase puede alcanzar hasta las 6 horas post-evento (48).

Este periodo que ocurre entre la fase de daño primario y el inicio del daño secundario se



denomina fase latente y/o periodo ventana y parece ser el momento óptimo para la aplicación de algunos de los principales tratamientos neuroprotectores conocidos (49).

#### 1.4.1.3 Fase secundaria

A pesar de la restauración de la perfusión cerebral, ya se habrán activado los mecanismos moleculares necesarios para iniciar la segunda fase del daño cerebral, la que se conoce como fallo energético secundario (6-48 horas). Durante este periodo, se producen una serie de reacciones bioquímicas, celulares y moleculares en cascada que extienden y agravan el daño del tejido nervioso en forma de infarto tisular, necrosis neuronal selectiva y apoptosis (50).

Durante esta fase los niveles de fosfato y ATP vuelven a caer pero, a diferencia del fallo primario, esta disminución no va acompañada de acidosis cerebral (42). En esta fase se perpetúa la cascada excitotóxica-oxidativa, empeora la función mitocondrial y se produce la activación de la microglia desencadenando una respuesta inflamatoria, la alteración de factores tróficos y de crecimiento y la síntesis o activación de proteínas que participarán en los procesos de apoptosis y necrosis (49,51).

#### 1.4.1.4 Fase terciaria

La fase terciaria es aquella que se produce días y hasta meses después del evento HI donde el daño cerebral se produce en forma de muerte celular tardía, remodelación y astrogliosis (52). En este periodo de daño tardío, parece que están implicados cambios epigenéticos así como la persistencia de mecanismos inflamatorios, conduciendo todo ello a alteraciones en el crecimiento axonal, en la neurogénesis y en la sinaptogénesis (53).

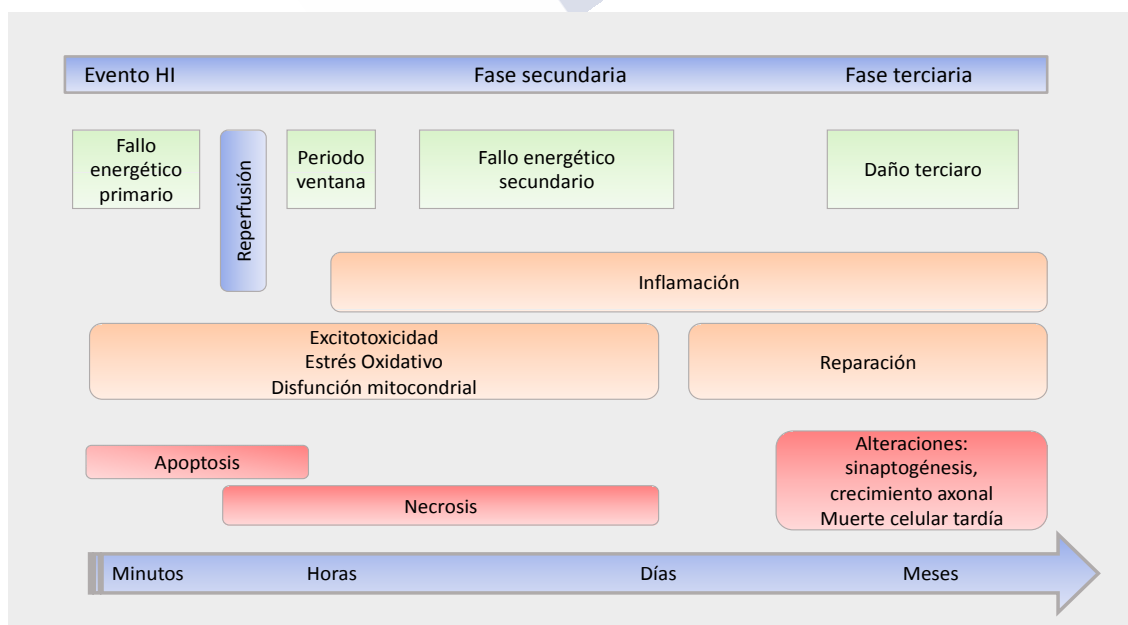


Figura 2. Esquema de fases del daño cerebral de la EHI. Imagen de elaboración propia.



### 1.4.2 Mecanismos implicados en el daño cerebral hipóxico-isquémico

El daño cerebral HI a pesar de estar dividido en diferentes fases para su comprensión, se trata en realidad, de un continuum de acontecimientos a nivel molecular que, por diferentes vías, acaban produciendo una lesión en el tejido cerebral y la consecuente muerte neuronal. Los mecanismos mejor conocidos y que se han implicado en la generación de este daño cerebral son: la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la inflamación y la muerte celular.

#### 1.4.2.1 Excitotoxicidad

La depleción energética que se produce en la HI prolongada reduce el gradiente iónico de las membranas de las células neuronales y gliales. Esto conlleva a la despolarización de las membranas y consecuentemente a la liberación de neurotransmisores al espacio extracelular. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio predominante en el cerebro. La mayoría de las neuronas, así como gran parte de la glía, poseen receptores de glutamato (54). Su mecanismo de recaptación es dependiente de energía y se ve comprometido al caer los niveles de glucosa, produciéndose un acúmulo del mismo en el espacio sináptico (55,56). El aumento de este aminoácido en el espacio extracelular da lugar a una sobre-activación de los receptores, en especial de los N-metil-D-aspartato (NMDA) y con ello a la apertura de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje (57).

Los receptores NMDA juegan un papel importante en el desarrollo cerebral promocionando la proliferación y migración de los de los precursores neuronales, el desarrollo sináptico y la plasticidad (58). Se ha estudiado que, para poder realizar estas funciones durante el desarrollo, estos receptores tienen una composición y una actividad diferente a la del cerebro del adulto. Es por ello que durante el periodo neonatal hay una gran densidad de receptores NMDA que se activan con mayor facilidad y durante más tiempo en comparación con los receptores NMDA de los adultos (59). Así mismo, se ha visto que la inyección de NMDA en el cerebro de rata neonatal produce un mayor daño que en el cerebro de la rata adulta (60). Estas características hacen que la vulnerabilidad del neonato a los estímulos excitatorios, como es la HI, sea mayor.

Diversos estudios en animales reflejan la importancia de la excitotoxicidad en la patogenia de la EHI neonatal. Así, la inyección directa de excitotoxina y la HI producen un daño en las neuronas postsinápticas con receptores NMDA y una disminución de la recaptación del glutamato por parte de la glía (51). También se ha visto que la administración del MK-801, antagonista del receptor NMDA, en ratas p7 antes del evento HI tiene un efecto neuroprotector (55).

Otro receptor de glutamato presente en las sinapsis excitatorias y que también interviene en las funciones de memoria y aprendizaje, así como en la estabilización de las sinapsis en el cerebro en desarrollo, es el receptor AMPA (alfa- amino-3 hidrox-5-methyl-4-isoxazol propionic acid) (61,62). Generalmente estos receptores son impermeables al calcio, excepto cuando carecen de la subunidad GluR2, situación que se da predominantemente en el cerebro

inmaduro, siendo por lo tanto otro mecanismo que contribuye a la activación de la cascada excitotóxica (45).

Tras la sobreactivación de los receptores AMPA permeables al calcio y los receptores NMDA por el evento HI, se produce la entrada de calcio en la célula y la consecuente activación de la enzima óxido nítrico sintasa (nNOS), liberándose cantidades masivas de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ). En relación a la enzima NOS, existen tres isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS), según su lugar principal de producción, aunque las tres han sido descritas en diversas poblaciones neuronales (63–65). Se ha observado que tras un episodio de isquemia se incrementa la actividad de la enzima NOS, siendo casi inmediato en las isoformas nNOS y eNOS, y más tardíamente en la iNOS (63). En estudios experimentales se observa que los ratones nNOS *Knock out* parecen ser menos vulnerables a la HI (66). También se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la iNOS/nNOS en crías de cerdo post-evento HI, disminuye el aumento de la actividad de la caspasa-3 (67).

El óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) tiene un efecto dual sobre el estrés oxidativo, en concreto sobre la peroxidación lipídica, por una parte reacciona con el superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) dando lugar a peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) iniciándose así la peroxidación lipídica y por otro, tiene un efecto antioxidante como captador de radicales alcoxil y peroxil (68). Además el óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) tiene funciones fisiológicas (induce la vasodilatación y angiogénesis, inhibe la agregación plaquetaria y la activación de leucocitos, modula el flujo sanguíneo cerebral y la producción de radicales libres en la mitocondria) (68,69) y neuroprotectoras (efecto antiapoptótico inhibiendo la liberación del citocromo c) (70). Por lo tanto, en cantidades fisiológicas es beneficioso para nuestro organismo, y es en situaciones patológicas, como la HI/reperfusión, donde sus niveles elevados darán lugar a un aumento de otros radicales libres.

La excitotoxicidad también contribuye a la disfunción mitocondrial que se produce en el contexto de un evento HI (71). Esta alteración de la mitocondria se traduce en una disminución de energía que impide mantener el gradiente iónico de membrana, perpetuando el ciclo de entrada de calcio.

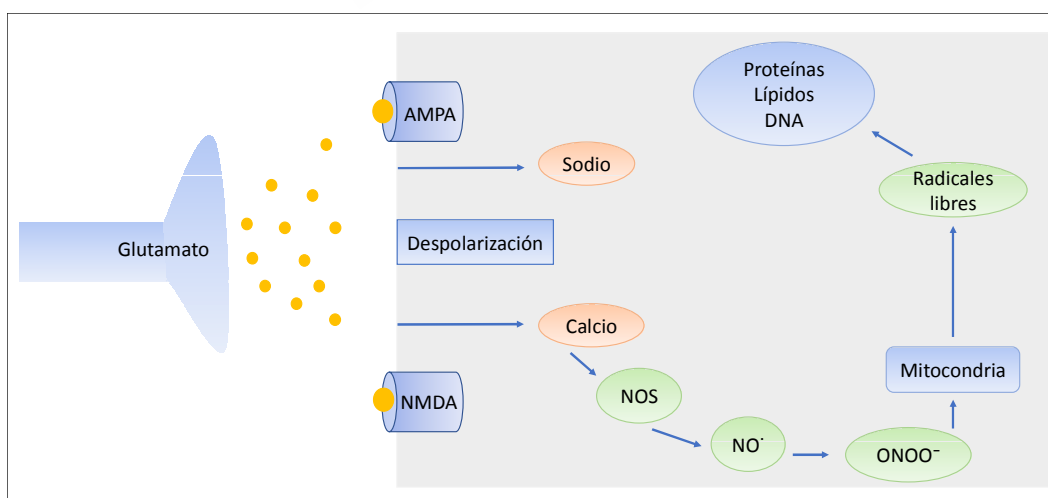


Figura 3. Dibujo esquemático de la cascada excito-oxidativa. Imagen de elaboración propia.

#### 1.4.2.2 Estrés oxidativo

En condiciones normales el organismo se halla en un equilibrio entre sustancias antioxidantes y prooxidantes (equilibrio redox), cuando este equilibrio se ve alterado se produce un aumento de la producción de radicales libres y de otras especies reactivas que es lo que conocemos con el término estrés oxidativo.

Como se menciona en el apartado anterior, la activación de la enzima NOS produce un aumento en la producción de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ). Cuando éste se produce en cantidades masivas reacciona más rápido con el radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) que con la enzima superóxido dismutasa, produciendo el potente oxidante peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el cual, por un lado, da lugar a la formación de diversas especies reactivas de nitrógeno (radical hidroxilo, dióxido nitrógeno e ion nitrógeno) y por otro, contribuye a la despolarización de la membrana celular y a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (complejos I-III) (72,73). Esta disfunción mitocondrial, a su vez, desencadena la liberación del radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) y con ello un mayor aumento en la producción de especies reactivas, ya que el superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formando el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Otras fuentes de generación del superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) en el contexto de HI, además de la derivada de la activación de NOS y de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, son la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa (63).

Toda esta generación de agentes oxidantes serán los responsables de la peroxidación lipídica, la oxidación proteica y la lesión del DNA que tendrá como resultado final el daño neuronal (74).

#### 1.4.2.3 Inflamación

En el contexto de un evento HI se produce también la activación de los astrocitos, la microglia/macrófagos, células polimorfonucleares, linfocitos, células NK, mastocitos y las células endoteliales (75). Esta activación da lugar a la liberación de una serie de citoquinas tales como el TNF-alfa, la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y la IL-6 que participan en la cascada excitoxídica desencadenada en el cerebro neonatal tras la HI y contribuyen, junto con los otros mecanismos descritos, a activar mecanismos de muerte celular (76). Las citoquinas producen la activación de diversas células entre ellas células fagocíticas que liberan proteínas tales como enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (77), generándose una relación estrecha entre la inflamación y el estrés oxidativo, ya que las ROS a su vez aumentan la permeabilidad capilar facilitando el paso de citoquinas.

#### 1.4.2.4 Muerte celular

La **necrosis** es un mecanismo de muerte celular precoz que se observa a los 30 minutos del evento HI. El déficit de oxígeno y nutrientes altera la integridad de la membrana celular y se produce la salida de sus componentes al espacio extracelular, conduciendo a la lisis y muerte celular (78). Aunque en el pasado se creía que la necrosis constituía un proceso

pasivo, actualmente se cree que existen mecanismos activos implicados; un ejemplo de necrosis regulada descrita en la HI neonatal es la necroptosis (79).

La muerte celular por **apoptosis** constituye un proceso progresivo y programado que requiere de energía, ya que es la propia célula dañada la que activa diferentes vías que conducirán a la muerte celular. Estudios en modelos de EHI han objetivado una mayor prevalencia de apoptosis en el cerebro inmaduro que en el del adulto (47).

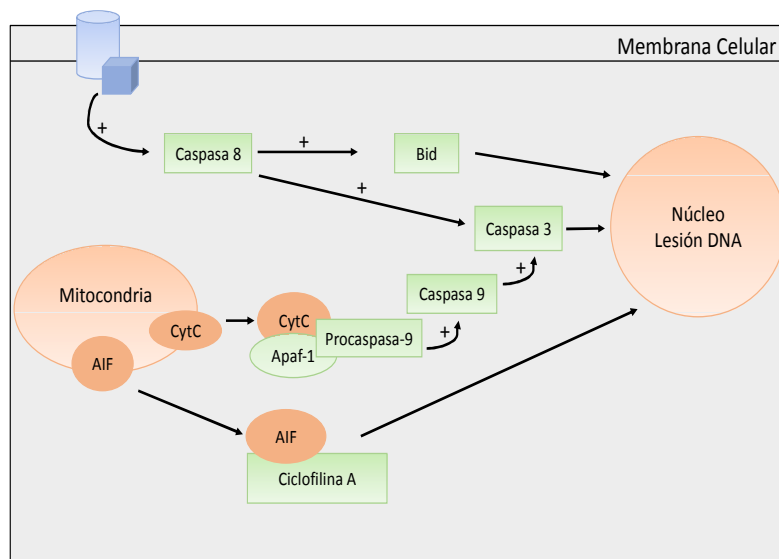
Esta muerte celular programada puede ser a través de dos vías de señalización intracelular: la intrínseca y la extrínseca. (Ver figura 4).

- En la **vía intrínseca** la mitocondria en situación de estrés libera factores apoptóticos que activan 2 vías de muerte celular programada: caspasa dependiente (citocromo C) y caspasa independiente (factor de inducción de apoptosis (AIF)).

En la *vía caspasa dependiente* el citocromo C se separa de la cardiolipina y se trasloca al citosol donde unido a la proteína Apaf-1 forma un aptosoma con la procaspasa-9. Este complejo activa a la caspasa-9 y éste a su vez a las caspasa-3, -6 y -7 (80). La caspasa-3 parece ser clave en el daño celular ya que su activación desencadena la degradación de gran cantidad de sustratos fundamentales para la supervivencia celular (24). Ésta, además, tiene una mayor actividad durante el periodo neonatal, contribuyendo a la vulnerabilidad que presenta el cerebro inmaduro a la hipoxia (81).

En la *vía caspasa independiente* el AIF se libera de la mitocondria e interactúa con la ciclofilina A en el citosol, este complejo se trasloca al núcleo donde produce la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina nuclear periférica (82). Cada vez hay más evidencias de que el AIF se activa cuando hay una depleción energética que impide la activación de la vía mediada por caspasas. Esta teoría se apoya con los trabajos publicados por Daugas y colaboradores que demuestran que la depleción de ATP actúa como un estimulador de la liberación de AIF (80,83). Es por ello por lo que algunos autores comienzan a llamar a esta vía necrosis programada.

- En la **vía extrínseca**, la apoptosis depende de la activación de receptores localizados en las membranas celulares y cuyos ligandos son citoquinas. Mediante esta ruta de inducción de apoptosis se activa la caspasa-8. La cual, por un lado, activa a otras caspasas, entre ellas la caspasa-3, y por otro, media la ruptura de la proteína Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) incrementando su actividad proapoptótica y provocando la permeabilización de la membrana mitocondrial (84).



**Figura 4. Resumen vías de apoptosis: vía intrínseca (caspasa dependiente y caspasa independiente) y vía extrínseca. Imagen de elaboración propia.**

La mitocondria tiene un papel fundamental en la regulación de la muerte celular. La permeabilización mitocondrial da lugar a la liberación de proteínas proapoptóticas finalizando el proceso en apoptosis irreversible. Los mecanismos que parecen implicados en la permeabilización mitocondrial tras un evento HI son de la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PPT) y la traslocación de proteínas proapoptóticas al citosol (85).

Aunque la muerte celular por necrosis y apoptosis son las más estudiadas en los modelos de EHI neonatal, existen otras vías de muerte celular programada, como es el caso de la autofagia. Se trata de un proceso intracelular lisosomal, fundamental para mantener la homeostasis celular, en el cual se degradan macromoléculas y organelas. En el momento actual existe controversia sobre si la autofagia tiene un factor protector o no después de un evento HI y se requieren más estudios que nos ayuden a comprender su papel en el daño HI (86,87).

## 1.5 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA

### 1.5.1 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres

Durante la fosforilación oxidativa mitocondrial se generan las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Se trata de compuestos que provienen de la reducción del oxígeno y que según el número de electrones reducidos darán lugar a diferentes ROS. En condiciones fisiológicas las ROS se generan en escasa cuantía ya que la mitocondria utiliza la mayor parte del oxígeno de la célula para producir ATP (88). Sin embargo, si ocurre un evento HI que daña a las células seguido de un periodo de reperfusión, la mitocondria se verá sobresaturada produciéndose un mayor acúmulo de ROS (85). Algunas de estas ROS como el anión

superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) o el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), así como algunas especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), forman parte de los llamados radicales libres. Se trata de especies con un electrón/es desapareado/s que les confiere una alta reactividad y una baja especificidad, reaccionando con mucha facilidad con otras moléculas y produciendo un daño celular por medio de diversos mecanismos: oxidando el DNA y los lípidos, alterando los potenciales de membrana y activando vías pro-apoptóticas (51). Así mismo, pueden reducir la respuesta vasoconstrictora de las arterias, dañar las células endoteliales y aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (89). No todas las ROS son radicales libres, pero sí pueden ser precursoras de éstos, un ejemplo de ello es el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que en presencia del hierro puede dar lugar a la formación del radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) a través de la reacción de Fenton. A su vez, el hierro libre no unido a proteínas (NBPI) puede catalizar la producción de diversas ROS y reaccionar con los lípidos, dando lugar a la formación de isoprostanos (90). Otras fuentes de generación intracelular de ROS, además de la mitocondria, son las enzimas pro-oxidantes xantina oxidasa (XO) y la NADPH oxidasa (NOX), que catalizan la formación del radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), así como el ácido araquidónico (91).

Tanto la cadena de respiración mitocondrial (CRM) como la XO y la NADPH oxidasa, han sido descritas como fuentes principales de generación de radicales libres tras un episodio de isquemia-reperfusión cerebral (92). Estudios *in vitro* en cultivos neuronales han detectado que tras la deprivación de oxígeno/glucosa existe un primer pico de liberación de ROS por parte de la CRM, un segundo pico al final del evento atribuido a la XO y finalmente un tercero secundario a la NADPH oxidasa durante la perfusión (92).

### 1.5.2 Sistemas antioxidantes

En condiciones fisiológicas, las ROS y las RNS se generan a bajas concentraciones y contribuyen a nuestro equilibrio homeostático, actuando como moléculas de señalización en muchos procesos fisiológicos tales como la regulación del tono vascular, la producción de eritropoyetina y la protección frente a microorganismos invasores y células malignas (93). Además participan en la modulación de la transmisión sináptica y no sináptica entre las neuronas y la glía (73).

Este equilibrio en los niveles de ROS se mantiene gracias a un sistema de defensa antioxidante que incluye mecanismos no enzimáticos (glutación, ac. ascórbico, vitaminas A, E y C...) y enzimáticos (enzima superóxido dismutasa, glutación peroxidasa, catalasa) (94). Uno de los sistemas más conocidos es el de la familia de enzimas Superóxido Dismutasa (SOD), del que se conocen 3 enzimas y que se distinguen entre ellas por sus características moleculares, su localización y el tipo de cofactores que necesitan para realizar sus acciones. Se denominan SOD1 (Copper/Zinc), SOD2 (Manganes/Zinc) y SOD3 (Cobre/Zinc), localizadas respectivamente en el citosol, en la mitocondria y en el espacio extracelular (68). Muchos de los sistemas antioxidantes están relacionados entre sí, precisándose mutuamente para una correcta detoxificación. Es el caso de las SOD que actúan frente a los radicales libres convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), siendo posible la transformación de este



último en agua gracias a la acción de la enzima glutatión peroxidasa o la catalasa. La enzima glutatión peroxidasa a su vez cataliza la conversión del glutatión reducido a oxidado, que puede ser posteriormente reducido por la enzima glutatión reductasa a expensas del NADPH.

Para el correcto funcionamiento de estos sistemas se precisa que la célula se encuentre en un adecuado estado energético (24). Los estudios demuestran que los sistemas antioxidantes juegan un papel importante en la protección del cerebro frente al daño oxidativo. Se ha descrito en experimentos *in vitro* que el enzima glutatión peroxidasa tiene un efecto protector sobre las neuronas inmaduras expuestas a la presencia del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (96). Otros trabajos demuestran que la inhibición de la síntesis del glutatión (GSH) produce un aumento del daño oxidativo (96). Dentro de la peculiaridad del cerebro inmaduro, parece que la sobreexpresión de la SOD 1 exacerba el daño cerebral, esto se cree que es debido a una menor capacidad de la catalasa y la glutatión peroxidasa en el periodo neonatal para eliminar el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) acumulado (97).

En los recién nacidos los sistemas antioxidantes se encuentran en menor concentración y son menos activos con respecto al adulto y cuando éstos se ven sobrepasados por la sobreproducción de ROS, se produce, como hemos mencionado previamente, el llamado estrés oxidativo.

Existen diversos métodos para cuantificar los sistemas antioxidantes, entre ellos se encuentran la medición de enzimas antioxidantes, el índice glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) y la actividad de vitaminas E y C (98).

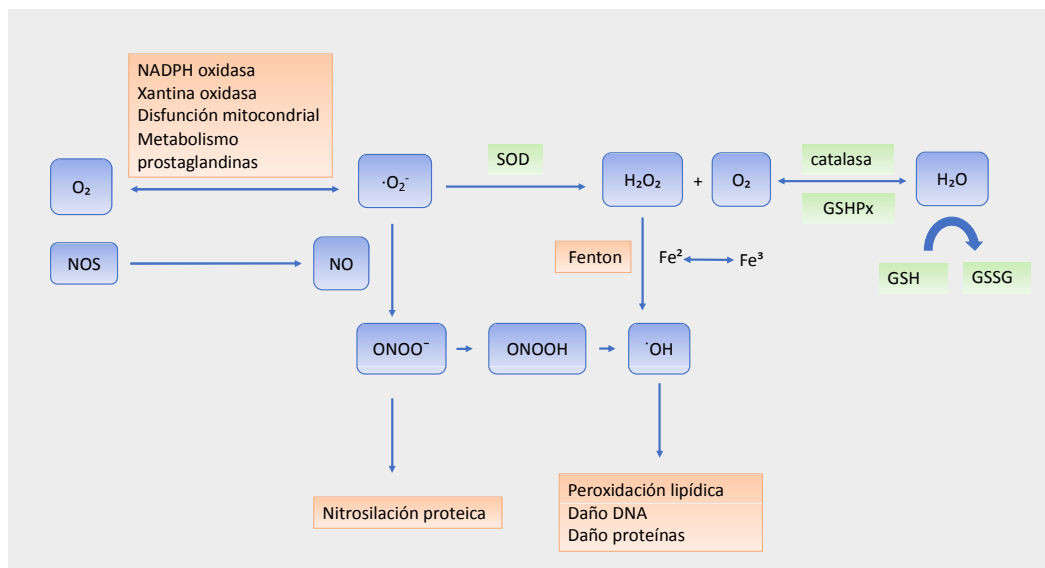


Figura 5. Esquema de generación de ROS tras un evento HI y acción detoxificante de los sistemas antioxidantes. Imagen de elaboración propia.

### 1.5.3 Estrés oxidativo y excitotoxicidad

El estrés oxidativo en el contexto de la HI está íntimamente ligado a la excitotoxicidad (84). Tal y como hemos descrito en apartados anteriores, la excitotoxicidad causa deplección energética, disfunción mitocondrial y la entrada masiva de calcio a la célula, derivando todo ello en un aumento de radicales libres que, a su vez, alteran el potencial de membrana de las células con la liberación consecuente de glutamato y la activación de los receptores NMDA, perpetuando de esta manera círculo de lesión celular (51).

### 1.5.4 Daño hipóxico-isquémico y estrés oxidativo

El cerebro del recién nacido tiene una serie de características que lo hacen más sensible a la HI y al estrés oxidativo. El periodo neonatal es de un periodo de rápido crecimiento y gran demanda energética, por lo que requiere un mayor flujo sanguíneo cerebral en comparación con el adulto. Todo ello se asocia a una inmadurez de los mecanismos de homeostasis, entre ellos los sistemas antioxidantes (menores niveles de glutatión peroxidasa, de SOD, de vitamina E, de ácido ascórbico) (90). Además, presenta unas características que lo hacen muy susceptible al efecto de los radicales libres: una mayor cantidad de hierro libre (necesario para procesos de diferenciación y maduración celular), una mayor producción de superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), un mayor contenido en ácidos grasos que constituyen la membrana lipídica y una mayor tendencia a la peroxidación lipídica (94,99).

Como hemos mencionado previamente, la existencia de zonas del cerebro más frecuentemente afectadas tras un evento HI, permite clasificar las lesiones en dos grandes patrones, sugiriendo algunos autores que la vulnerabilidad de estas zonas se debe más a las características intrínsecas de las neuronas allí localizadas que a otros factores, como puede ser la anatomía vascular cerebral (47). Se trata de regiones ricas en receptores de glutamato y se postula que sus circuitos excitatorios neuronales son más maduros y que por ello son más sensibles a la HI que otras zonas donde estos circuitos todavía no están bien establecidos en el periodo neonatal (100). Apoyando el papel de la excitotoxicidad en los patrones de lesión, se ha observado que estas regiones, en especial los ganglios de la base, también expresan nNOS (74). Existen trabajos en crías de rata donde la destrucción de neuronas que contienen nNOS antes de un evento HI disminuye la lesión cerebral (101). Curiosamente el globo pálido no suele estar afectado tras un evento HI, se cree que es debido a que la actividad excitatoria mantenida del putamen lo inhibe (54). La excitotoxicidad está íntimamente relacionada con el estrés oxidativo ya que ésta conducirá a un aumento de las ROS favorecido por un ambiente rico en hierro y deficitario en sistemas antioxidantes. Apoyando el importante papel del estrés oxidativo en el daño neuronal, existen numerosos estudios experimentales que sugieren que la sobreexpresión de la enzima glutatión peroxidasa, fundamental para la detoxificación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , disminuye el daño tras un evento HI, así como el tratamiento con moléculas quelantes del hierro como la deferoxamina (13,102,103).

Toda esta cadena de eventos que ocurre tras el episodio de HI en el cerebro neonatal, al que se le suma también la cascada inflamatoria, desembocará en la muerte neuronal. A ello se



le añade que la muerte celular programada, necesaria para la correcta maduración cerebral, es un proceso relativamente frecuente en esta etapa de la vida y esta circunstancia hace que se active más fácilmente las vías de muerte celular tras un evento HI (13).

Cuando nos referimos al cerebro más inmaduro, al pretérmino, la lesión secundaria a la HI afecta fundamentalmente a la sustancia blanca, siendo su forma más severa la leucomalacia periventricular (LPV) (104). Se cree que la gravedad del daño se debe a una combinación de factores: inmadurez en la anatomía vascular cerebral, alteraciones en la autorregulación y factores metabólicos regionales (105). Una de los mecanismos principales de daño en la sustancia blanca tras un evento HI es la peroxidación lipídica que tiene lugar en los oligodendrocitos inmaduros (90). Estas células son fundamentales para la mielinización y en sus estadios más inmaduros (pre-oligodendrocitos), células predominantes en la sustancia blanca del pretérmino, presentan una serie de características que las hacen más sensibles al daño oxidativo y a la excitotoxicidad. Entre estas características se encuentran: menores defensas antioxidantes, su elevado contenido en hierro necesario para su diferenciación y una elevada expresión de receptores de glutamato (104). La afectación secundaria a la HI sobre estas células implicará una perturbación en la maduración de la línea oligodendroglial, produciéndose una alteración en la mielinización y una disrupción axonal, activándose incluso en algunos casos procesos de reparación aberrantes entre los cuales se incluye la gliosis (105).

#### **1.5.5 Biomarcadores de estrés oxidativo**

La determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en la EHI permite valorar, de forma biológica, la magnitud de la lesión y la evolución del proceso, así como el posible efecto de las terapias neuroprotectoras. Los radicales libres se caracterizan por tener una vida media muy corta lo que dificulta su medición *in vivo*, por ello han aparecido otro tipo de determinaciones (biomarcadores) en tejido y fluidos que nos reflejan el daño oxidativo sobre lípidos, proteínas, DNA y otras macromoléculas (90).

Dentro de las características que debe de tener el biomarcador ideal se encuentran: una alta especificidad y sensibilidad, que sea fácilmente accesible y lo menos invasivo posible, reproducible con métodos automatizados y económico. Lamentablemente la metodología de muchos de estos biomarcadores es compleja y costosa limitándose por el momento su uso a estudios de investigación (106).

En la siguiente tabla presentamos algunos de los principales biomarcadores de estrés oxidativo utilizados en estudios clínicos en el periodo perinatal.

Oxidative biomarkers	Target biomolecule	Modification	Biological sampling	Analytical method
Glutathione (GSH/GSSG ratio)	Antioxidants	General Redox Status	Total Blood	LC-MS/MS
o-Tyrosine (o-Tyr/Phe ratio)	Proteins		Urine	HPLC-MS/MS
m-Tyrosine (m-Tyr/Phe ratio)	Proteins		Urine	HPLC-MS/MS
3N2-Tyrosine	Proteins	Tyrosine nitration	Urine	HPLC-MS/MS
8OHdG (8OHdG/2dG ratio)	DNA		Urine/Plasma/Serum /CSF/AF	HPLC-MS/MS
F2-IsoPs	DNA	DNA oxidation	Urine/Plasma/Serum /CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
D2/F2-IsoPs	DNA	DNA oxidation	Urine/Plasma/Serum /CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
IsoFs	DNA	DNA oxidation	Urine/Plasma/Serum /CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
NeuPs	DNA	DHA Peroxidation	Urine/Plasma/CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
NeuFs	DNA	DHA Peroxidation	Urine/Plasma/CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS

*Abbreviations:* GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; o-Tyr: ortho-tyrosine; m-Tyr: meta-tyrosine; 3N2-Tyrosine: 3-nitrotyrosine; 8OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 2dG: 2'-deoxyguanosine; IsoPs: isoprostanes; IsoFs: isofurans; NeuPs: Neuroprostanes; NeuFs: neurofurans; AA: arachidonic acid; DHA: docosahexanoic acid; CSF: cerebral spinal fluid; AF: amniotic fluid; LC: liquid chromatography; GC: gas chromatography; MS/MS: tandem mass spectrometry.

**Tabla 1. Resumen: Biomarcadores de estrés oxidativo utilizados en estudios clínicos en el periodo perinatal. Tabla extraída de Torres-Cuevas I y colaboradores (106). Licencia Creative Commons.**

## 1.6 ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCIÓN EN LA ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA

### 1.6.1 Hipotermia

Durante todo el siglo XX no se dispuso de ninguna estrategia terapéutica específica para prevenir o aminorar el daño cerebral asociado al daño HI perinatal. Afortunadamente, la aparición de la hipotermia moderada sostenida como estrategia para el tratamiento la agresión HI en el sistema nervioso central ha implicado un cambio radical en esta patología.

Estudios experimentales en animales grandes (cerdo, cordero) demostraron una neuroprotección histológica y funcional tras la aplicación de hipotermia moderada. El efecto de la hipotermia también ha sido evaluado en el modelo de EHI en roedor con la ventaja de

poder estudiar sus beneficios a largo plazo (107). Una de las principales limitaciones que presentaban los primeros estudios sobre la hipotermia en modelos de roedores fue la utilización de crías de rata del día postnatal 7 (p7). El cerebro de estos animales se corresponde a un cerebro humano de 32-36 semanas de edad gestacional, por lo que no representa el cerebro de los recién nacidos a término, principal población candidata para la aplicación de la hipotermia (33). En los últimos años, se ha ido definiendo un modelo de EHI neonatal en crías de rata p10-p11 más acorde, desde el punto de vista del desarrollo cerebral, con cerebro del recién nacido a término. La aplicación de hipotermia moderada en estos animales también demostró una neuroprotección a corto y largo plazo (108).

Tras obtener resultados muy consistentes en animales, tanto en beneficios terapéuticos como en seguridad, se iniciaron los primeros ensayos clínicos en recién nacidos, que incluyeron pacientes con clínica de EHI de más de 35 semanas de gestación al nacimiento. Estos trabajos, demostraron que la reducción de la temperatura cerebral en 3-4°C mediante un enfriamiento corporal total o selectivo de la cabeza, iniciado antes de las 6 horas post-evento (fase de ventana terapéutica) y mantenido durante 72 horas, seguido de un recalentamiento lento (0.5°C/hora), constituye una intervención eficaz para reducir la mortalidad y la discapacidad mayor en los supervivientes de 18 a 24 meses (6,109–113). El beneficio de la hipotermia en estos ensayos se observó tanto en los casos de EHI moderada como en los graves. El seguimiento a los 7-8 años del NICHD *Whole Body Cooling trial* demostró una reducción significativa en mortalidad, mortalidad o discapacidad mayor, mortalidad o parálisis cerebral (7,114).

Los mecanismos biológicos por los cuales la hipotermia moderada protege o reduce el daño cerebral HI no son bien conocidos, aunque muchos autores apuntan su papel en la reducción del metabolismo cerebral, liberación de aminoácidos excitatorios, estabilización de la barrera hemato-encefálica, inhibición de la muerte celular programada, bloqueo de la cascada inflamatoria, entre otros (115–117). En las siguientes líneas entramos más en detalles:

- Reducción del metabolismo cerebral, liberación aminoácidos excitatorios y radicales libres: parece que la hipotermia reduce un 5% el metabolismo cerebral por cada grado que desciende la temperatura. Esto protege a la célula disminuyendo o retrasando la despolarización de su membrana y consecuentemente disminuyendo el acúmulo de los aminoácidos excitatorios. También se ha observado que la hipotermia disminuye la formación de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) y superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ).
- Estabilización de la barrera hematoencefálica (BHE): parece que la hipotermia aplicada precozmente tras el episodio de HI previene la disrupción de la BHE, estabilizándola.
- Inhibición de la muerte celular programada: la hipotermia disminuye la activación de la caspasa-3, así como de la caspasas -8 y -9 y la traslocación del citocromo C, implicados en las vías extrínsecas e intrínsecas de la muerte celular por apoptosis. La hipotermia así mismo, disminuye la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial.
- Bloqueo de la cascada inflamatoria: la hipotermia suprime la síntesis de citoquinas y neurotoxinas y también inhibe la activación microglial.

- Otras acciones de la hipotermia: reduce la extensión del daño cerebral, las crisis comiciales, el uso energético y preserva estructuras del hipocampo.

De todas estas acciones atribuibles a la hipotermia, los mecanismos que actualmente parece que juegan un papel más importante como neuroprotectores son: la reducción de la muerte cerebral programada y de la cascada inflamatoria (115).

Recientemente, han aparecido publicaciones que sugieren un potencial efecto protector de la hipotermia sobre el estrés oxidativo y la alteración del equilibrio redox (118). Todo ello sugiere que la hipotermia tiene un gran poder de atenuación/modulación sobre el fallo energético secundario. Además de actuar en diversos puntos de las múltiples cascadas bioquímicas que conducen al daño, la hipotermia prolonga la duración de la ventana terapéutica y podría tener algún papel en la potenciación de la regeneración y reparación neural post-isquemia (116).

A pesar de que la hipotermia ha significado un gran avance en el tratamiento de los recién nacidos afectados de EHI, el número de neonatos que es necesario tratar (NNT) para evitar un caso de muerte o discapacidad severa a los 18 meses aun no es óptimo (NNT 6 en las EHI moderadas y 7 en las EHI severas) (119). La incidencia de muerte y discapacidad sigue siendo muy elevada a pesar del tratamiento con hipotermia (40% aproximadamente) (119), por lo que urgen nuevas intervenciones que potencien su efecto. Es por ello por lo que existe la necesidad de investigar la eficacia de otras terapias neuroprotectoras adicionales con el objetivo de mejorar los resultados actuales y aumentar el número de neonatos con una supervivencia intacta tras una agresión HI perinatal.

## **1.6.2 Alopurinol**

### **1.6.2.1 Alopurinol como fármaco antioxidante**

El alopurinol es un isómero de la hipoxantina y a través del aldehído oxidasa, se metaboliza en su mayor parte a su metabolito, el oxipurinol. Ambos son inhibidores de la xantino-oxidasa (XO), bloqueando la conversión de la hipoxantina a xantina e inhibiendo consecuentemente la producción de ácido úrico. El bloqueo de la XO también disminuye la producción de radicales libres generados secundariamente (120). En 1966 el alopurinol fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de la gota y hoy en día continúa siendo un pilar fundamental para el tratamiento de la hiperuricemia primaria o secundaria. Con el tiempo se ha ido observando, tanto en estudios clínicos como experimentales, su posible efecto beneficioso en enfermedades vasculares, inflamatorias, cardíacas así como en patologías de isquemia/reperfusión (121).

El alopurinol además, previene la degradación del ATP y preserva la integridad del receptor de NMDA; a dosis elevadas posee propiedades antioxidantes como quelante del hierro, neutralizador de los radicales hidroxilo e inhibidor de la peroxidación lipídica (122–125). También se ha observado que inhibe el acúmulo de neutrófilos (126).

## 1.6.2.2 Xantina-oxido-reductasa y ROS/RNS

La xantina-oxido-reductasa (XOR) es un enzima clave en el catabolismo de las purinas, cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico. Tiene 2 formas intercambiables: la xantina deshidrogenasa (XDH) y la XO. Se diferencian entre ellas en que la XDH puede reducir el oxígeno y el  $\text{NAD}^+$ , aunque presenta mayor afinidad por el  $\text{NAD}^+$ , mientras que la XO solo puede utilizar el oxígeno como receptor de electrones durante la oxidación de sus sustratos, generando en esta reacción la formación de anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a través de la reducción de un electrón y dos electrones respectivamente (127,128). La cantidad de electrones transferidos al oxígeno y por lo tanto de formación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o de superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) depende la tensión de oxígeno, el pH y la concentración de purinas. En condiciones fisiológicas el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es el que se produce en mayor cantidad y se ve favorecido todavía más su aumento durante la hipoxia (129). En el contexto de un episodio HI, se ha observado que aumenta la actividad de la XOR con conversión a su forma oxidada (XO), aunque es importante destacar que la propia XDH puede generar ROS mediante la oxidación del NADH. Además, el incremento de la hipoxantina que ocurre por degradación del ATP que se restaura de nuevo la oxigenación, generando los productos peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Estos productos, en presencia de hierro, contribuirán a la formación del radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ).

Además, en condiciones de hipoxia la XO puede dar lugar a la formación de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) a partir de nitritos. El óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) junto con el superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), generado a raíz de la actividad de la XO, contribuirá a la formación de RNS (128,130).

En resumen, la actividad de la XOR en un contexto de HI/reperfusión constituye una fuente importante de generación de ROS/RNS (122) que, sumado a otras fuentes de generación de especies oxidantes, como la mitocondria, contribuirán a la fisiopatología del daño cerebral del recién nacido con EHI.

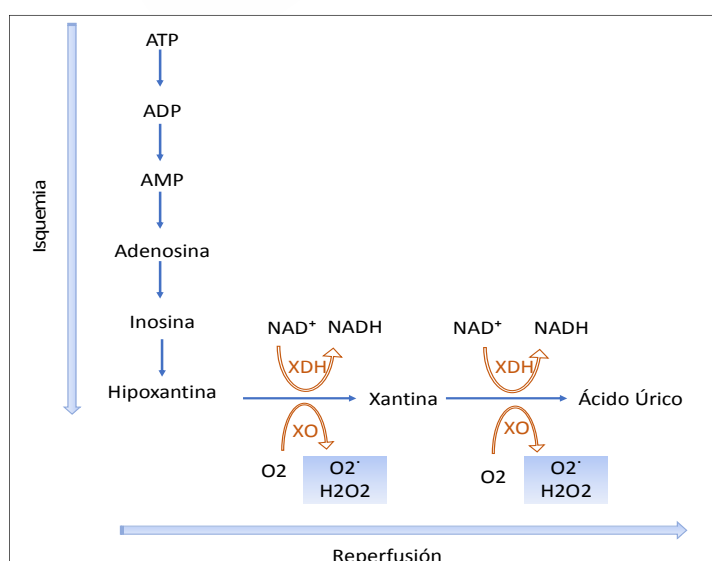


Figura 6. Esquema de la acción de la XOR tras un episodio HI/reperfusión. Esquema de elaboración propia.

### 1.6.2.3 Alopurinol como fármaco neuroprotector: estudios experimentales

Uno de los primeros fármacos neuroprotectores utilizados de forma experimental en animales fue el alopurinol (131). Los primeros trabajos, de principios de los 90, se realizaron en ratas del día p7 a las que se les administraba el fármaco pre-evento HI, observándose como esto preservaba el metabolismo cerebral (132). Además, su aplicación 30 minutos antes de inducir la HI disminuía el edema cerebral así como el área infartada (133).

Posteriormente el mismo grupo publicaba su efecto protector administrado 15 minutos tras la hipoxia, reduciendo la atrofia y el edema cerebral, así como el daño histológico (134). Su aplicación post-evento HI en otros modelos de EHI neonatal (cerdos) demostraron, mediante espectroscopia-RM y T2-RM, una mejoría en el estado energético cerebral y una disminución del edema vasogénico pero sin observar mejoría a nivel de daño celular (caspasa-3 activada, histología y daño en DNA) (123).

Marro y colaboradores aportaron información acerca de los mecanismos de acción del alopurinol: la disminución de los niveles de ácido úrico en el grupo tratado con alopurinol en un modelo porcino de EHI, implicaba la inhibición de la vía XO que tiene como producto final el ácido úrico. Otros mecanismos atribuidos a este fármaco fueron la preservación de la actividad de la bomba Na-K-ATPasa y la disminución de la conversión de la inosina a hipoxantina en los grupos sometidos a HI (135,136), así como un efecto quelante del hierro y neutralizador de radicales hidroxilo (124,125,131).

### 1.6.2.4 Alopurinol como fármaco neuroprotector: estudios en humanos

A partir de los resultados obtenidos en los modelos animales, empezaron a valorarse los primeros trabajos que intentaban demostrar el papel neuroprotector del alopurinol sobre el daño HI en recién nacidos. Aunque existen muy pocos estudios en humanos y en todos ellos el alopurinol fue la única estrategia neuroprotectora utilizada, los resultados han sido muy dispares. Su aplicación profiláctica (500 mg/endovenoso), en madres con trabajo de parto y sospecha de estado fetal no tranquilizador (EFNT: alteración en el RCTG y/o pH calota <7.20, 53 madres/54 fetos) demostró un posible efecto protector para el daño cerebral perinatal (una disminución de proteína S-100B y menores niveles de hierro libre no unido a proteínas en sangre de cordón en los fetos que alcanzaron niveles terapéuticos de alopurinol) (137). El mismo grupo realizó también un estudio multicéntrico y aleatorizado alopurinol/placebo administrado a 222 gestantes con sospecha de estado fetal no tranquilizador en el que no se pudo demostrar una disminución de los marcadores de daño cerebral (proteína S-100B) y de estrés oxidativo (8-isoprostanos, neuroketal) pero el análisis *post hoc* demostró un beneficio potencial en los recién nacidos niñas de madres tratadas con alopurinol (menores niveles de proteína S-100B y neuroketal) (138). Con respecto a los efectos secundarios es importante destacar que fue un fármaco seguro tanto para las gestante como para los niños recién nacidos (139).

Una de las ventajas que ofrece la administración prenatal del alopurinol es la precocidad del tratamiento, persiguiendo con ello la disminución en la formación de radicales libres que



se generan tras la fase de reperfusión en un evento HI. Sin embargo, esta forma de administración tiene una limitación importante: la dificultad para predecir qué fetos presentarán una EHI tras el nacimiento sin tener que sobretratar a las madres ni a los niños (131). Otra limitación en este tipo de administración la encontramos en que pueden existir casos de partos inminentes donde no se llegue a tiempo de alcanzar los niveles terapéuticos del alopurinol.

En la misma línea, pero ya en recién nacidos, se han publicado 3 pequeños ensayos con 114 niños (en total) afectados de EHI a los que se les administró alopurinol postnatal. Van Bel y colaboradores realizaron en los 90 un estudio piloto en recién nacidos afectados de EHI, en el que se administraron 40 mg/kg de alopurinol repartidos en dos dosis (140). Se observó una reducción del NBPI y del ácido úrico, una mejoría en la perfusión cerebral, en la actividad cortical cerebral y ausencia de signos de toxicidad derivados del alopurinol. No pudieron demostrar ni la disminución de la peroxidación lipídica ni de los parámetros antioxidantes analizados. Como limitaciones del estudio se encuentra la muestra pequeña y la ausencia de ciego que los mismos autores apuntaban.

En el estudio a doble ciego de Benders y colaboradores no se evidenció una mejoría en la mortalidad ni en la morbilidad a corto plazo de los niños con EHI que habían recibido alopurinol (141). Hay que destacar que en este trabajo se incluyeron pacientes con EHI grave y moderada. Posteriormente fueron publicados los datos de los dos estudios anteriormente mencionados, sobre el seguimiento neurológico a largo plazo de estos pacientes, demostrando que los niños con EHI moderada tratados con alopurinol presentaban mejores resultados a los 4-8 años (142).

El último trabajo publicado fue el 2007 de Gunes y colaboradores, donde el alopurinol fue administrado durante 3 días consecutivos a dosis de 20 mg/kg, con una dosis inicial que se dio de forma más precoz que en los 2 estudios anteriores (antes de las 2 horas de vida en vez de antes de las 4 horas de vida), observando una disminución en los niveles de óxido nítrico ( $\bullet$ NO) así como una reducción de la morbilidad a corto plazo (año de vida). No se objetivaron diferencias en mortalidad y fue un fármaco seguro (143).

La revisión sistemática de la Cochrane Database realizada el año 2008 sobre la utilización del alopurinol como terapia para la EHI, concluye que con los datos disponibles en ese momento, no se puede recomendar la utilización del alopurinol como tratamiento estándar para los niños afectados de EHI, alentando a la realización de más trabajos para valorar su posible eficacia (131)(144).

Como se ha señalado, todos estos estudios son de la era prehipotermia, por lo que aún no existen demostraciones en estudios experimentales y clínicos sobre la eficacia terapéutica de la combinación de ambas terapias.

En la actualidad hay dos ensayos clínicos que están evaluando el efecto del alopurinol administrando precozmente, uno durante el parto (NCT00189007) y otro inmediatamente después (The European ALBINO trial).

### 1.6.3 Otras terapias coadyuvantes

Actualmente se están realizando estudios tanto a nivel clínico como experimental, con otras posibles terapias coadyuvantes a la hipotermia con el fin de mejorar el pronóstico de los recién nacidos afectados de EHI. A continuación, se resumen algunas de ellas.

#### 1.6.3.1. Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína endógena producida en el hígado en el periodo fetal y en el riñón e hígado en el periodo neonatal, cuyo principal efecto es la estimulación de la eritropoyesis, participando también en procesos antiinflamatorios, de angiogénesis y neurogénesis (145). La EPO y su receptor se encuentran expresados en muchos tejidos, entre ellos el SNC en desarrollo (146) y en situación de HI se ha visto un aumento en la expresión de los receptores de EPO (147). La EPO atraviesa la BHE, esto sumado a la mayor permeabilidad de la BHE tras un evento HI, permite aumentar sus niveles en el líquido cefalorraquídeo (42).

Estudios en modelos animales han demostrado su efecto neuroprotector (148,149), y entre sus acciones parece que la EPO aumenta la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y disminuye los niveles de peroxidación lipídica en crías de rata con EHI (150).

Con respecto a los humanos existen varios estudios publicados, Zhu y colaboradores objetivaron un mejor desarrollo psicomotor en los niños con EHI moderada a los 18 meses pero no en los niños afectados de EHI grave (151). Elmahdy y colaboradores también objetivaron un beneficio a nivel motor, de EEG y desarrollo neurológico en los niños con EHI que recibieron EPO (152).

Recientemente se han publicado los resultados del ensayo clínico: “Neonatal Erythropoietin and Therapeutic Hypothermia Outcomes in Newborn Brain Injury” (NEATO) donde la administración de dosis altas y múltiples de EPO en combinación con la hipotermia reduce la severidad del daño cerebral valorado por RM de los niños con EHI moderada/severa y parece que mejora la evolución motora a corto plazo de estos pacientes (153). Está en marcha el ensayo fase III donde se valorará la evolución a largo plazo que nos aportará mayor información.

#### 1.6.3.2 Melatonina

La melatonina (N-actil-5-metoxitriptamina) es una indolamina endógena con efecto antioxidante (disminuye la toxicidad de los radicales libres transfiriendo electrones al radical hidroxilo y al peroxinitrito y aumenta la producción de enzimas antioxidantes), efecto antiinflamatorio y propiedades anti-apoptóticas. Es un fármaco que cruza la BHE y en modelos animales de EHI ha demostrado su eficacia en monoterapia (154) o coadyuvante a la hipotermia (155).

En relación a su aplicación en humanos, un ensayo clínico que incluyó 30 pacientes muestra resultados prometedores en asociación con hipotermia, observando una disminución



del estrés oxidativo así como una mejoría en el neurodesarrollo a los 6 meses en los pacientes tratados (156). Factores como dosis y duración óptima del tratamiento están pendientes todavía de definir.

Una limitación importante de la melatonina es que es hidrofóbica, por lo que se utiliza con frecuencia el etanol como diluyente. Éste, en estudios experimentales, parece implicado en la activación de mecanismos apoptóticos en el cerebro en desarrollo, por lo que se hace necesaria la búsqueda de otros diluyentes. A pesar de esto, pequeños estudios en neonatos y prematuros no han observado efectos adversos en relación con la administración de melatonina (157).

#### 1.6.3.3 Topiramato

Se trata de un fármaco antiepiléptico que inhibe la excitabilidad neuronal bloqueando los receptores de glutamato (158). Además, entre otras funciones, tiene la capacidad de bloquear los canales de Na, Calcio y el PPT de la mitocondria (159–161). En experimentación animal se ha detectado que la administración pre-evento HI disminuye el daño cerebral y produce una mejora a nivel cognitivo (162). A nivel clínico, se ha visto que su uso combinado con la hipotermia es seguro, pero no se ha demostrado una disminución de la mortalidad ni de la severidad del daño (163). Se necesitan más estudios para evaluar la capacidad neuroprotectora de este fármaco en la EHI, están en marcha otros ensayos clínicos como el HYPOTOP study group (Vento y colaboradores).

#### 1.6.3.4 Xenon

Este gas noble utilizado ampliamente en anestesia tiene, entre otras propiedades, la capacidad de inactivar los receptores de NMDA y por tanto de disminuir la excitotoxicidad (164). En modelos animales de EHI se ha demostrado un efecto neuroprotector en combinación con la hipotermia: en crías ratas se observó una mejoría tanto desde el punto de vista histológico como funcional (165) y en modelo porcino el tratamiento combinado se asoció con una importante disminución del daño a nivel histológico (166). Su efecto es fácilmente reversible a través de la eliminación pulmonar siendo su elevado coste su principal inconveniente (157).

Desde el punto de vista clínico, también se ha probado que es un fármaco seguro aunque no se demostró un beneficio tras su administración (167,168), y actualmente se esperan los resultados de otro ensayo clínico (Xenon and Cooling Therapy in Babies at High Risk of Brain Injury Following Poor Condition at Birth: A Randomised Pilot Study, NCT01545271).

#### 1.6.3.5 Cannabidiol

El cannabidiol, el componente principal no psicoactivo del *cannabis sativa*, es un agonista de receptores de serotonina 5HT1A. Tiene entre sus principales efectos la reducción de la liberación de glutamato y de IL-6, la disminución de la expresión de NOS, la inhibición de la entrada de calcio, disminuyendo con todo ello a la actividad de las vías pro-apoptóticas (169,170).

A nivel experimental, se ha visto que disminuye el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y la inflamación en ratones y cerdos recién nacidos (169,171,172). Estos efectos se han observado también recientemente en combinación con la hipotermia (173). Parece que existe un beneficio añadido a la hipotermia en la evaluación a corto plazo, quedando pendiente de determinar a nivel experimental su efecto a largo plazo.

#### 1.6.3.6 Terapia con células madre

La terapia con células madre supone una línea de investigación muy prometedora donde ya se han observado importantes beneficios en patologías como los accidentes cerebro vasculares (ACV) del adulto (174). En el recién nacido existen varias situaciones en las que los mecanismos de daño cerebral tienen similitudes fisiopatológicas con el ACV del adulto, como son la EHI, el ACV neonatal y la leucomalacia periventricular, por lo que también se está investigando este tipo de terapia (174,175).

La sangre de cordón es una fuente de células madre y tiene como ventaja que se puede obtener de una forma relativamente sencilla tras el parto para la realización de un trasplante autólogo (42).

Hay evidencia de que la administración de células de sangre de cordón tras el parto en un modelo animal de parálisis cerebral mejora la función motora de una forma dosis dependiente (176). Con respecto a la EHI, en trabajos donde aplicaban el tratamiento combinado hipotermia y células madre mesenquimales se obtuvo una disminución del daño a nivel histológico y por RM, una disminución de citoquinas en LCR y una mejoría en los tests cognitivo-motor en las ratas con EHI severa (177).

A nivel clínico en neonatos con EHI se ha demostrado que se puede administrar con la hipotermia y es seguro (178). Parámetros como dosis y tiempo óptimo de administración todavía se encuentran pendientes de investigar en profundidad (157).



# 2

## **Hipótesis y Objetivos**

---



## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 HIPÓTESIS**

La administración de la terapia combinada hipotermia + alopurinol tras un evento hipóxico-isquémico (HI) disminuye el daño oxidativo en crías de rata sometidas a un modelo de encefalopatía hipoxico isquémica (EHI) moderada.

### **2.2 OBJETIVOS**

#### **Objetivo principal**

Determinar si la terapia combinada hipotermia + alopurinol en un modelo animal de EHI confiere una mejor neuroprotección frente al estrés oxidativo en sangre, en líquido cefalorraquídeo y en tejido cerebral, en comparación con el tratamiento sólo con hipotermia.

#### **Objetivos secundarios**

1. Determinar si la administración de hipotermia + alopurinol como tratamiento neuroprotector en un modelo animal de EHI mejora la capacidad antioxidante total en sangre y líquido cefalorraquídeo.
2. Valorar si la administración de hipotermia + alopurinol como tratamiento neuroprotector disminuye la oxidación de proteínas en sangre en un modelo animal de EHI.
3. Establecer si el tratamiento neuroprotector hipotermia + alopurinol protege de la peroxidación lipídica en el tejido cerebral (córtex e hipocampo) en un modelo animal de EHI.





3

## **Material y Métodos**

---





## **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 ANIMALES Y ESTABULARIZACIÓN**

Se utilizaron un total de 64 crías de rata Wistar de 10 días de vida (p10) (pesos 12-24 gramos) procedentes de 10 parejas de ratas Wistar adultas (Harlam Ibérica). Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (08:00-20:00) y en condiciones controladas de humedad ( $50\% \pm 10\%$ ) y temperatura ( $22 \pm 2$  °C), siendo estas condiciones consideradas las óptimas para estos animales.

El estudio se realizó en la Unidad de Experimentación Animal del Hospital Sant Joan de Déu de la Universidad de Barcelona. El procedimiento fue aprobado por el comité de experimentación animal de la Universidad de Barcelona (CEEa) en cumplimiento del Decreto 214/97 de la Generalitat de Catalunya, 2010/63/UE de la Unión europea y RD 53/2013 de España. Número de permiso 6575 (Anexo 1).

Las crías se mantuvieron con la madre hasta el momento de la intervención quirúrgica con acceso libre a la alimentación materna. Las madres fueron alimentadas según el protocolo habitual. A los 10 días de vida las crías fueron sometidas a los procedimientos descritos posteriormente (apartado 3.2.).

Al finalizar el protocolo experimental, a los 13 días de vida, fueron sacrificadas con sobredosis de anestesia según el protocolo de la Unidad de Experimentación Animal del Hospital Sant Joan de Déu de la Universidad de Barcelona.

En el estabulario del Sant Joan de Déu se realiza un control diario de los animales por personal experimentado. Se valora el estado general del animal mediante la observación de su aspecto, comportamiento y control de peso, según los protocolos establecidos por la Unión Europea.

### **3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **3.2.1 Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica**

Para la inducción de EHI se utilizó la técnica de Rice-Vannucci (20), ya validada y ampliamente utilizada en la literatura, que describimos brevemente a continuación.

Los animales son anestesiados con isoflurano inhalado (inducción: 4%; mantenimiento: 2% vaporizado en oxígeno a 3 l/min) y mantenidos a 36-37 °C durante todo el procedimiento.

Se realiza una incisión a nivel supraclavicular en la cara anterolateral izquierda. Una vez

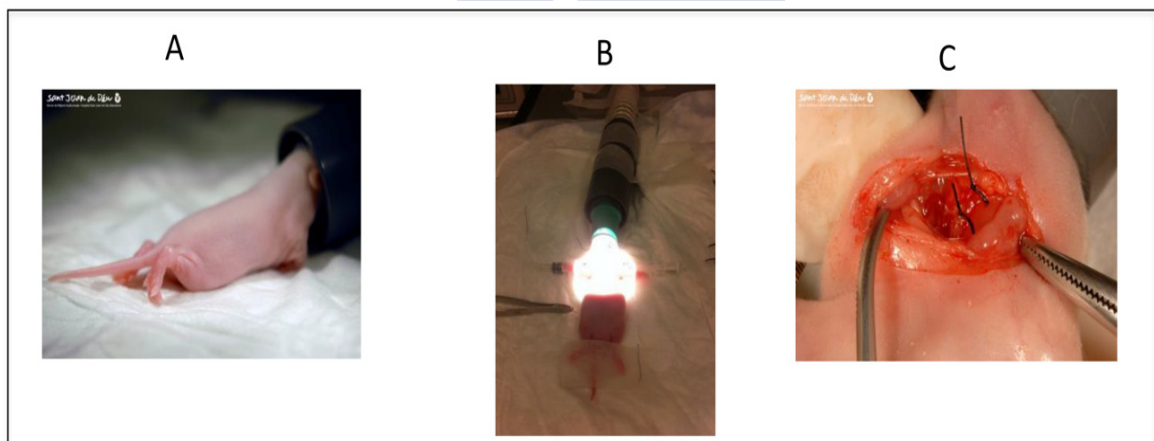
expuesto y disecado el tejido adiposo se visualiza el paquete vascular que incluye la vena yugular, la arteria carótida y el nervio vago. Se procede a la disección de éstos y una vez aislada la arteria carótida se realiza una doble sutura con seda de 3.0 y posterior electrocoagulación según el método descrito previamente por el grupo de Martínez-Orgado (179) (Ver figura 7).

Posteriormente se cierra la incisión quirúrgica con una sutura simple.

En nuestro trabajo, para la realización del protocolo quirúrgico se utilizó un microscopio quirúrgico (Ver figura 8).

Al despertar de la cirugía las crías se devuelven con la madre durante 30 minutos. Posteriormente se someten a hipoxia. Existen diferentes protocolos de hipoxia según el tipo de lesión deseada. En nuestro trabajo para conseguir un daño moderado sometimos a los animales a una atmósfera al 8% de oxígeno y 92% de nitrógeno (N<sub>2</sub>) durante 90 minutos a 36.5°C. Consideramos daño moderado aquel en el que había una mortalidad post-evento hipóxico entre el 10-15%.

Una vez finalizado el tratamiento los animales son devueltos con sus madres.



**Figura 7. Diferentes momentos del procedimiento quirúrgico: (A) Inducción anestésica (mezcla de isofluorano y oxígeno). (B) Colocación del animal en posición supina, los brazos y la cabeza extendidos para la correcta disección del paquete vascular izquierdo. (C) Visualización directa de la sutura, realizada mediante la técnica descrita (disección del paquete vascular con ligadura de la carótida izquierda separando la vena yugular y el nervio recurrente) (120).**

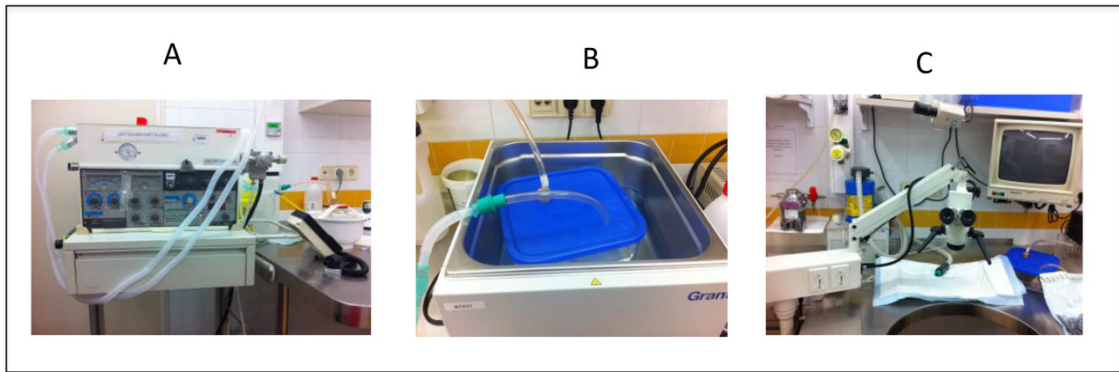


Figura 8. Material utilizado para el modelo hipoxia-isquemia: (A) Mezclador de gases: Para conseguir la mezcla de gases hipóxicos utilizamos un respirador SERVO 900 con la adaptación de las tubuladuras a una conexión de oxígeno y a nitrógeno. Con ello obtuvimos una mezcla gaseosa de oxígeno al 8%. Para comprobarlo se utilizó un sensor de oxígeno. (B) Recipiente de cristal utilizado como cámara hipóxica, en la superficie se pueden observar dos orificios: uno de ellos es la rama inspiratoria de la mezcla de gases y el otro la rama espiratoria. En la imagen se puede apreciar que la cámara se encuentra introducida en un recipiente de agua para regular la temperatura. (C) Para realizar el procedimiento quirúrgico se utilizó el microscopio que aparece en la figura (120).

### 3.2.2 Tratamiento con hipotermia

En todos los animales, el tratamiento se inició 15 minutos después de la finalización de la hipoxia. Los animales se aleatorizaron en dos grupos: normotermia e hipotermia. Los animales del grupo normotermia se colocaron en una cámara de cristal que se mantuvo sumergida en agua a temperatura estable a 36-37° durante 5 horas (ver figura 9). Los animales del grupo hipotermia se colocaron en una cámara con las mismas características con la temperatura del agua necesaria para que la temperatura rectal de los animales fuese de 32-33°C. A las 5 horas, los animales de ambos grupos se devolvieron con sus madres.

La duración y el nivel de temperatura se estableció según datos de otros trabajos de la literatura (31,107,165).



Figura 9. Tratamiento mediante hipotermia. Los animales se colocaron en un recipiente de cristal sumergido en una fuente con capacidad de termorregulación. Los animales se mantuvieron entre 32-33°C. Para evitar que los animales se transmitiesen calor se colocaron separadores entre ellos (120).

### 3.2.3 Tratamiento con alopurinol

Quince minutos después de finalizar el procedimiento quirúrgico y antes de empezar la hipotermia, los animales aleatorizados al grupo alopurinol recibieron 135 mg/kg de alopurinol pH 11.2 (Zyloprim sodium, Burroughs Wellcome, Research Triangle Park) intraperitoneal. La dosis administrada se decidió a partir de la revisión de la literatura previa, siendo la utilizada por Palmer (133,134).

Los animales aleatorizados al grupo Hipoxia se les administró el volumen equivalente (0.2-0.3 ml) de suero salino fisiológico también intraperitoneal. (Ver figura 10).



Figura 10. Administración intraperitoneal farmacológica. Administración intraperitoneal de alopurinol o de un volumen equivalente de suero salino fisiológico (0.2-0.3ml) (120).

### 3.2.4. Grupos de estudio

Los animales utilizados se randomizaron de forma aleatoria en los siguientes grupos:

**Grupo 1. Grupo Control o “sham-operated”:** Los animales de este grupo fueron sometidos al mismo protocolo quirúrgico descrito posteriormente (anestesia, incisión supraclavicular y visualización del paquete vascular) pero no se les realizó ninguna manipulación de los vasos, tampoco fueron sometidos a hipoxia. La duración del tiempo de anestesia fue similar a la de los otros grupos. Al finalizar el procedimiento quirúrgico se mantuvieron en un ambiente normotérmico controlado a 36-37°C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

**Grupo 2. Grupo Hipoxia:** Los animales de este grupo fueron sometidos al procedimiento quirúrgico de HI según el método de Rice-Vannucci (20). A los 15 minutos del evento HI se les administró suero salino fisiológico (0.2-0.3 ml) intraperitoneal. Posteriormente al procedimiento se mantuvieron en ambiente normotérmico controlado a 36-37°C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

**Grupo 3. Grupo Alopurinol:** Los animales de este grupo fueron sometidos al procedimiento quirúrgico de HI según el método de Rice-Vannucci (20). A los 15 minutos del evento HI se les administró 135 mg/kg (0.2-0.3ml) de alopurinol intraperitoneal, pH 11.2 (Zyloprim sodium, Burroughs Wellcome, Research Triangle Park) (134). Al igual que los animales de los dos grupos anteriores, posteriormente al procedimiento quirúrgico se mantuvieron en ambiente normotérmico controlado a 36-37°C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

**Grupo 4. Grupo Hipotermia:** Los animales de este grupo fueron sometidos al procedimiento quirúrgico de HI según el método Rice-Vannucci (20). A los 15 minutos del evento HI se les administró suero salino fisiológico (0.2-0.3 ml) intraperitoneal. Posteriormente se mantuvieron en hipotermia controlada a 32-33°C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres (31).

**Grupo 5. Grupo hipotermia + alopurinol:** Los animales de este grupo fueron sometidos al procedimiento quirúrgico de HI según el método Rice-Vannucci (20). A los 15 minutos del evento HI se les administró 135 mg/kg (0.2-0.3 ml) de alopurinol intraperitoneal, pH 11.2 (Zyloprim sodium, Burroughs Wellcome, Research Triangle Park). Posteriormente se mantuvieron en hipotermia controlada a 32-33°C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

### 3.2.5 Obtención y procesamiento de las muestras

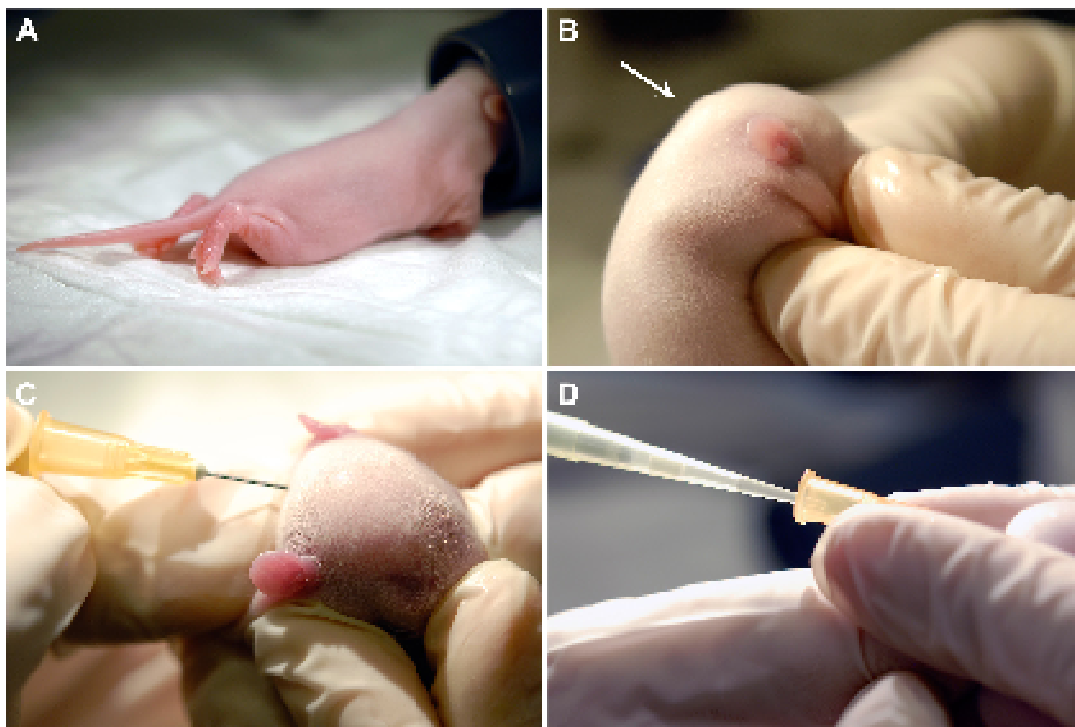
A los 13 días de vida (tres días después del procedimiento anterior), los animales fueron anestesiados y posteriormente sacrificados siguiendo el protocolo establecido. Se obtuvieron muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo de cada animal, conservándose después de su procesamiento inmediatamente a -80°C.

Para la extracción del líquido cefalorraquídeo (LCR) en crías de rata se utilizó una técnica previamente validada y publicada por nuestro grupo, que resumimos a continuación (180) (Ver figura 11).

Los animales se colocan en una superficie estéril y se anestesian con isoflurano (4%). Para la realización de la punción, uno de los investigadores sujeta al animal posicionándolo con el cuello flexionado, de forma que la cabeza queda en un ángulo de 90° facilitando la visualización de un espacio de forma romboidea entre el orificio occipital y el inicio de la columna cervical. Se localiza en la línea media entre las dos orejas, siendo fácilmente palpable. Un segundo investigador, guiándose por palpación, introduce una aguja de 24-G de forma perpendicular, con el bisel hacia arriba, a una profundidad de entre 0,5-1 mm. Cuando se detecta salida del LCR, éste se recoge mediante una pipeta automática y se transfiere a un tubo Eppendorf.

Las muestras visualmente hemáticas se descartaron.





**Figura 11. Técnica de recogida de LCR: (A) Inducción anestésica (B) Posicionamiento del animal en un ángulo de 90°. La flecha muestra el punto de punción. (C) aguja de 24 G, bisel hacia arriba, insertado perpendicular. (D) LCR recogido con una pipeta 20 µl.(180)**

Después de la obtención de fluidos los animales fueron sacrificados, mediante una inyección de intraperitoneal de anestésico según protocolo. Rápidamente se procedió a la extracción del cerebro en bloque y a su congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para su utilización, el cerebro congelado fue seccionado en cortes coronales de un grosor de 3 mm aproximadamente, encima de placas metálicas mantenidas en hielo seco. La localización y disección del hipocampo, y zona córtico-subcortical se realizó bajo un microscopio Nikon SMZ645 (16-100x) utilizando una base de hielo seco para no romper la cadena de frío.

### **3.3 ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

Con las muestras obtenidas se realizaron, en colaboración con el Hospital Universitario de Burgos, estudios de capacidad antioxidante total (FRAP y ABTS), estudio de los niveles del antioxidante endógeno glutatión (GSH) y del cociente glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG), niveles de grupos carbonilos y niveles de F2-isoprostanos (8-isoprostano).

### 3.3.1 Estudio en plasma y líquido cefalorraquídeo de la capacidad antioxidante total

Se evaluó la capacidad antioxidante total en sangre mediante los métodos FRAP y ABTS y en el LCR se utilizó el método ATBS.

El FRAP se expresa en mM de Fe (II) y el ABTS como capacidad antioxidante total (TEAC) expresado como mM Trolox.

#### Método ABTS

Se fundamenta en la decoloración del radical catión  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato) que presenta un máximo de absorción espectrofotométrica a 734 nm. En presencia de un agente antioxidante se produce una decoloración del compuesto y una disminución de la absorbancia (181).

La mezcla de reacción se preparó mezclando ABTS 7 mM con  $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$  2,45 mM. Para las muestras de plasma, a 250  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción se añadieron 1,25  $\mu\text{L}$  de plasma, se incubaron 4 minutos y se leyó la absorbancia a  $\lambda = 734 \text{ nm}$ .

#### Método FRAP

Este método consiste en la determinación del poder reductor de las muestras, según el método descrito por Benzie y Strain (182). Se basa en el incremento de absorbancia a 593 nm debido a la formación del complejo TPTZ-Fe (II) (Tripiridil-S-triazine con hierro (II)) en presencia de un agente reductor.

Para realizar las determinaciones se preparó el reactivo TPTZ con 25 mL del tampón acetato sódico 0,3 M pH 3,6, 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  20mM, 2,5mL de TPTZ 10mM (preparado en HCl 40 mM) y 3 mL de agua miliQ. Se adicionó 4 $\mu\text{L}$  de plasma a 196  $\mu\text{L}$  del reactivo TPTZ, se agitó durante 1 minuto y se incubó a 37°C durante 30 minutos, determinando su valor de absorbancia a 593 nm. Los resultados se expresaron en mM Fe (II) a partir de la correspondiente recta de calibrado.

### 3.3.2 Estudio en plasma de los niveles del antioxidante GSH y el cociente GSH/GSSG

Se estudiaron en sangre los niveles de GSH y el cociente GSH/GSSG.

#### Método GSH y cociente GSH/GSSG

Los niveles totales de glutatión fueron determinados utilizando el método descrito por Griffith y colaboradores (183). El glutatión total fue evaluado con un método enzimático en el cual, el GSH es oxidado por el ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH en presencia de glutatión reductasa. La formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico

(TNB) se midió a 410 nm. El contenido total de glutatión de la muestra fue determinado por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de GSH. El GSSG fue determinado por el mismo método después de tratar las muestras con 2-vinilpiridina.

### **3.3.3 Estudio en plasma de los niveles de grupos carbonilo**

Los niveles de grupos carbonilo fueron estudiados en sangre como marcador de oxidación a proteínas.

#### Medición grupos carbonilo

El procedimiento utilizado en nuestro trabajo es el desarrollado por Levine y colaboradores (184). Se basa en la reacción equimolecular de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas. La DNFH unida a proteínas se cuantifica espectrofotométricamente tras la separación de las proteínas desnaturalizadas por precipitación con un ácido y posterior solubilización con guanidina.

Se mezclaron 10  $\mu$ L de plasma con 500  $\mu$ L de DNFH al 0,2% (p/v) en HCl 2 N, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 500  $\mu$ L de TCA al 20% (p/v) y se dejó actuar durante 15 minutos a 0-4°C para permitir la precipitación de las proteínas. Se centrifugaron a 6000g durante 3 minutos, descartándose el sobrenadante. Para eliminar el exceso de reactivo libre, se lavó el precipitado tres veces con 1 mL de una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1) dejándolo a temperatura ambiente 10 minutos entre lavado y lavado. Posteriormente se redisolvió el precipitado con 1 mL de guanidina 6 M pH 2,3 en tampón fosfato sódico 20mM pH 6,5 y se dejó agitando cada muestra durante 20 minutos en oscuridad. Finalmente se incubaron las muestras a 37°C durante 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 373 nm frente a la solución de guanidina. El contenido de carbonilos se expresó como nmoles de grupos carbonilo/mg proteína.

### **3.3.4 Estudio en tejido cerebral de los niveles de F2-isoprostanos**

Se utilizó la medición de los niveles de F2-isoprostanos, concretamente del 8-iso-PGF2 $\alpha$ , en hipocampo y zona córtico-subcortical como biomarcador de peroxidación lipídica.

#### Medición del 8-isoprostano (8-iso-PGF2 $\alpha$ )

Para ello se utilizó el kit de bionova, OxiSelect™ 8- iso-Prostaglandin F2 $\alpha$  ELISA Kit, siguiendo las instrucciones indicadas. Los resultados se obtienen por interpolación en una curva de calibrado y se expresan como pg de isoprostanos/ mg de proteína.



A continuación, mostramos un resumen del material y método.

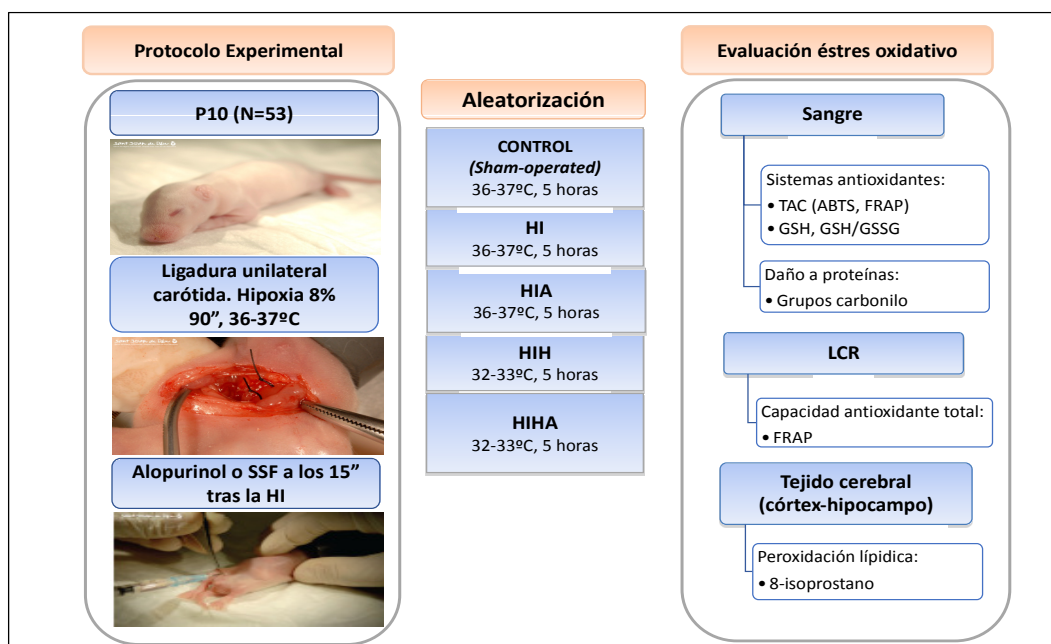


Figura 12. Esquema de diseño experimental. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

### 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.4.1 Capacidad antioxidante total

Para determinar la capacidad antioxidante total (FRAP y ABTS) se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica para determinar la existencia de diferencias entre los 5 grupos.

Los resultados se expresaron en mediana y rango intercuartil, aunque también incluimos media y desviación estándar. Se realizó también un análisis *post-hoc* con la prueba de Bonferroni para valorar las diferencias intergrupo, aceptando  $p < 0.05$  como significación estadística.

Para determinar si la distribución de los niveles de FRAP y ABTS era diferente según el sexo se utilizó la misma técnica. Para determinar si existían diferencias en los niveles de FRAP y ABTS entre sexos se usó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney.

#### 3.4.2 GSH y cociente GSH/GSSG

Para determinar los niveles de GSH y el cociente GSH/GSSG se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica para determinar la existencia de diferencias entre los 5 grupos.

Los resultados se expresaron en mediana y rango intercuartil, y también se incluyó media y desviación estándar. Se realizó también un análisis *post-hoc* con la prueba de Bonferroni para valorar las diferencias intergrupo, aceptando  $p < 0.05$  como significación estadística.

Para determinar si la distribución de los niveles de GSH y del cociente GSH/GSSG era diferente según el sexo se utilizó la misma técnica. Para determinar si existían diferencias en los niveles de GSH y del cociente GSH/GSSG entre sexos se usó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney.

### **3.4.3 Grupos carbonilo**

Para determinar los niveles de grupos carbonilo se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica para determinar si existían diferencias entre los 5 grupos. Los resultados se expresaron en mediana y rango intercuartil, media y desviación estándar. Se realizó también un análisis *post-hoc* con la prueba de Bonferroni para valorar las diferencias intergrupo, aceptando  $p < 0.05$  como significación estadística.

Para determinar si la distribución de los niveles de grupos carbonilo en sangre era diferente según el sexo se utilizó la misma técnica. Para determinar si existían diferencias en los niveles de los grupos carbonilo en sangre entre sexos se usó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney.

### **3.4.4 F2-isoprostanos (8-isoprostano)**

Para determinar los niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF $2\alpha$ ) se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica determinar si existían diferencias entre los 5 grupos. Los resultados se expresaron en mediana y rango intercuartil, aunque también se incluyeron media y desviación estándar. Se realizó también un análisis *post-hoc* con la prueba de Bonferroni para valorar las diferencias intergrupo, aceptando  $p < 0.05$  como significación estadística.

Para determinar si la distribución de los niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF $2\alpha$ ) en córtex-subcortical e hipocampo era diferente según el sexo se utilizó la misma técnica. Para determinar si existían diferencias en los niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF $2\alpha$ ) en córtex-subcortical e hipocampo entre sexos se usó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Todos los datos fueron analizados con los programas estadísticos STATA 13 y SPSS 17.



# 4

## Resultados

---



## 4 RESULTADOS

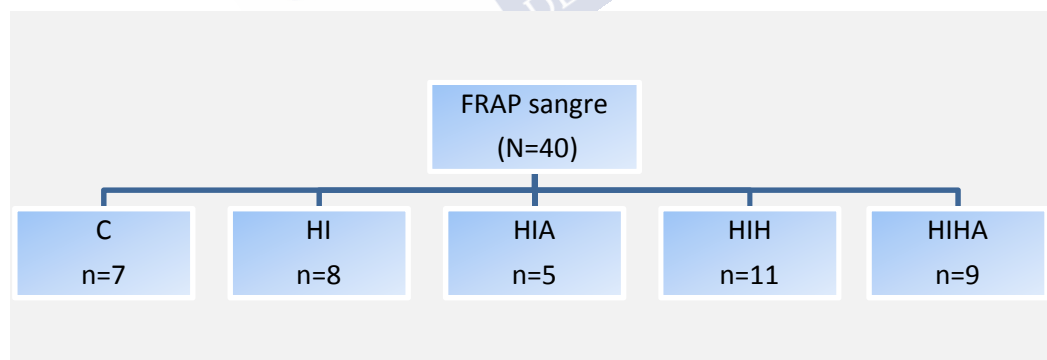
Para evaluar el efecto antioxidante de los diferentes tratamientos administrados se realizó el estudio antioxidante en sangre (capacidad antioxidante total con el método FRAP y con el método ABTS, niveles de glutatión, cociente GSH/GSSG), estudio antioxidante en líquido cefalorraquídeo (capacidad antioxidante total con el método FRAP), oxidación de proteínas (grupos carbonilo) en sangre y oxidación de lípidos (F2-isoprostanos (8-isoprostano)) en hipocampo y zona córtex-subcortical. Para ello se utilizaron un total de 64 crías de rata del día postnatal 10.

### 4.1 ESTUDIO ANTIOXIDANTE EN SANGRE

#### 4.1.1 Capacidad Antioxidante total

##### 4.1.1.1 Método FRAP

Se analizaron los niveles de FRAP en sangre a las 72 horas del evento hipóxico-isquémico (HI).



Esquema 1. Flujo de animales utilizados para la medición de FRAP en sangre. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Tabla 2. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles de FRAP en sangre de cada grupo expresado en mMFESO4. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

FRAP sangre (mMFESO4)		
Grupos	Mediana [IC 95%]	Media (ES)
C	0.561 [0.399-0.629]	.525 (0.035)
HI	0.279 [0.241-0.367]	.298 (0.020)
HIA	0.414 [0.385-0.501]	.427 (0.020)
HIH	0.443 [0.333-0.464]	.423 (0.026)
HIHA	0.475 [0.437-0.540]	.489 (0.020)

En relación a los niveles de FRAP se detectaron diferencias entre los grupos, observándose una disminución significativa de estos niveles en el grupo HI ( $p < 0.003$ ).

En el análisis *post-hoc* se objetiva como los niveles de FRAP aumentan en los grupos que han recibido hipotermia sola o combinada con alopurinol (HIH, HIHA) en comparación con el grupo HI (HIH  $p = 0.019$ , HIHA  $p < 0.001$ ) (Ver figura 13).

En cuanto al análisis por sexo, cuando se analiza FRAP en sangre en cada uno de los géneros (machos  $p = 0.010$ , hembras  $p = 0.040$ ) vemos que los resultados son similares al análisis global. Cuando se analiza si existen diferencias en los niveles de FRAP en sangre entre sexos no se detectaron diferencias ( $p = 0.599$ ).

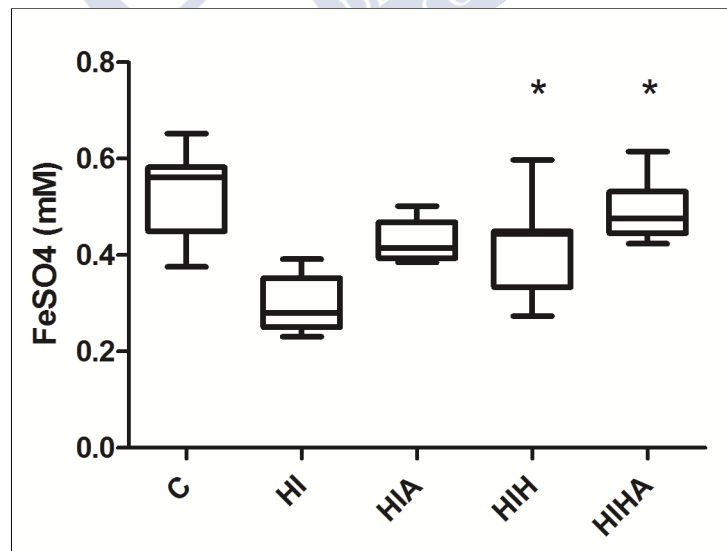
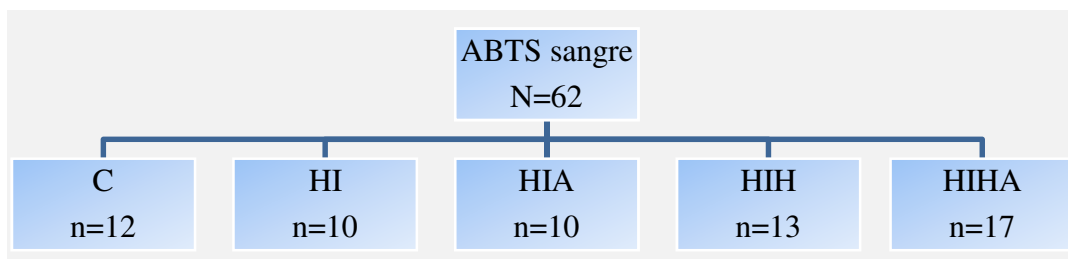


Figura 13. Diagrama de cajas de los niveles de FRAP en sangre en cada condición tratada. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol. \*  $p < 0.05$  en el análisis *post-hoc* de los grupos tratamiento con respecto al grupo HI.

## 4.1.1.2 Método ABTS

Se analizaron los niveles de ABTS en sangre a las 72 horas del evento HI.



Esquema 2. Flujo de animales utilizados para la medición de ABTS en sangre. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Tabla 3. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles de ABTS en sangre de cada grupo expresado en TEACmM. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

ABTS (TEACmM)		
Grupos	Mediana [IQ95%]	Media(ES)
C	5.549 [5.32-5.92]	5.629 (0.10)
HI	3.959 [3.42-4.26]	3.938 (0.122)
HIA	5.63 [5.11-5.81]	5.47 (0.130)
HIH	4.41 [4.04-4.62]	4.38 (0.097)
HIHA	4.88 [4.62-5.05]	4.94 (0.104)

En cuanto a la capacidad antioxidante medida por ABTS, los animales del grupo HI presentan también unos niveles más bajos y estadísticamente diferentes a los grupos que reciben tratamiento con alopurinol (HIA, HIHA) ( $p < 0.001$ ), pero no a los animales tratados exclusivamente con hipotermia (HIH) ( $p = 0.194$ ). También en el análisis *post-hoc* se observa como el grupo con terapia combinada (HIHA) difiere de los animales tratados con hipotermia (HIH) ( $p < 0.001$ ). (Ver figura 14)

En cuanto al análisis por sexo, cuando se analiza ATBS en sangre en cada uno de los géneros (machos  $p < 0.001$ , hembras  $p = 0.001$ ) vemos que los resultados son similares al análisis global. Cuando se analiza si existen diferencias en los niveles de ATBS en sangre entre sexos no se detectaron diferencias ( $p = 0.6378$ ).

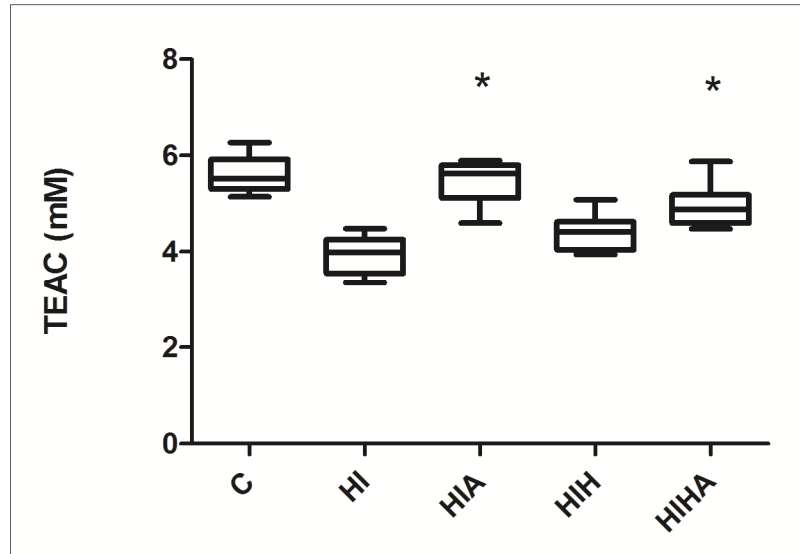
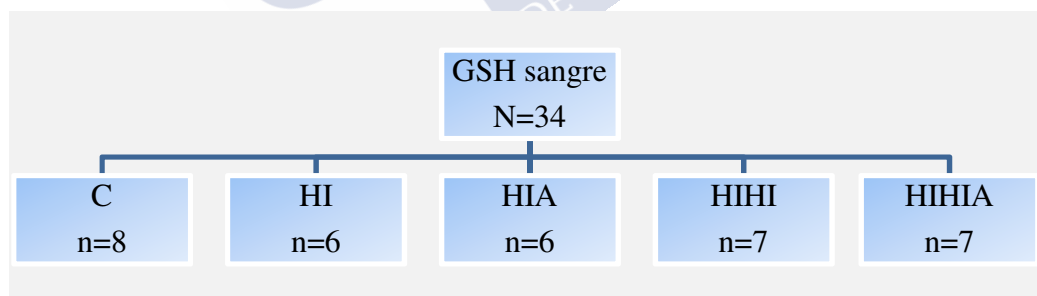


Figura 14. Diagrama de cajas de los niveles de ABTS en sangre según condición. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol. \*  $p < 0.05$  en el análisis *post-hoc* de los grupos tratamiento con respecto al grupo HI.

#### 4.1.2 Niveles de GSH

Se analizaron los niveles de glutatión en sangre a las 72 horas del evento HI.



Esquema 3. Flujo de animales utilizados para la medición de GSH en sangre. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.



Tabla 4. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles de GSH en sangre de cada grupo expresado en mmol/gHb. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia, HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol, HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia, HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

GSH (mmol/gHb)		
Grupos	Mediana [IQ95%]	Media(ES)
C	1.67 [1.22-2.39]	1.736 (0.18)
HI	1.33 [0.75-2.10]	1.366 (0.21)
HIA	3.29 [3.03-4.04]	3.406 (0.15)
HIH	1.94 [1.80-2.91]	2.181 (0.18)
HIHA	2.40 [1.84-3.25]	2.455 (0.20)

Existen diferencias en cuanto a los niveles de GSH entre los diferentes grupos ( $p < 0.001$ ). Se observan unos niveles más altos de GSH en todos los grupos que recibieron tratamiento (HIA  $p < 0.001$ , HIH  $p = 0.020$ , HIHA  $p = 0.001$ ) cuando se comparan con el grupo HI. Destaca que los grupos que recibieron alopurinol (HIA, HIHA) presentan los niveles de GSH más elevados que el grupo HI ( $p < 0.001$  y  $p = 0.002$ , respectivamente) e incluso que en el grupo control.(Figura 15)

En cuanto al análisis por sexo, cuando se analiza GSH en sangre en cada uno de los géneros (machos  $p = 0.03$ , hembras  $p = 0.018$ ) vemos que los resultados son similares al análisis global. Cuando se analiza si existen diferencias en los niveles de GSH en sangre entre sexos no se detectaron diferencias ( $p = 0.498$ ).

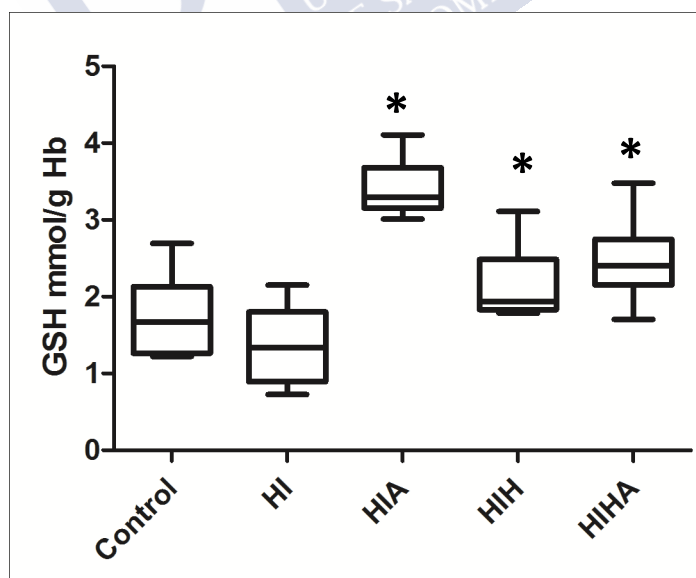
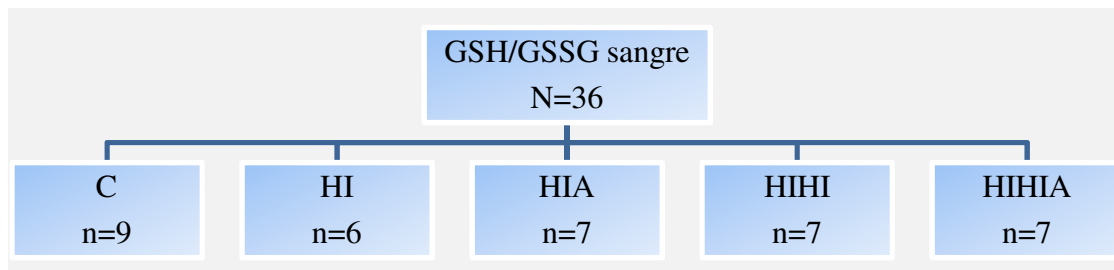


Figura 15. Diagrama de cajas de los niveles de GSH en sangre según condición. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia, HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol, HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia, HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol. \*  $p < 0.05$  en el análisis *post-hoc* de los grupos tratamiento con respecto al grupo HI.

### 4.1.3 Cociente GSH/GSSG

Se analizó el cociente GSH/GSSG en sangre a las 72 horas del evento HI.



Esquema 4. Flujo de animales utilizados para la medición de GSH/GSSG en sangre. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIHI: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHIA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Tabla 5. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles del cociente GSH/GSSG en sangre en cada grupo. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIHI: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHIA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Cociente GSH/GSSG		
Grupos	Mediana [IQ95%]	Media(ES)
C	2.23 [1.99-2.67]	2.310 (0.113)
HI	1.55 [1.45-1.64]	1.550 (0.03)
HIA	4.65 [2.85-5.65]	4.237 (0.448)
HIHI	3.73 [2.20-5.14]	3.718 (0.514)
HIHIA	2.80 [2.47-4.50]	3.195 (0.338)

Al analizar el cociente GSH/GSSG, el grupo HI presenta unos niveles más bajos cuando se compara con los grupos que recibieron tratamiento (HIA, HIHI, HIHIA) ( $p<0.001$ ). Al igual que pasa con GSH, los niveles en el grupo alopurinol (HIA) son los más elevados, incluso comparados con los del grupo control ( $p<0.001$ ). (Ver figura 16).

En cuanto al análisis por sexo, cuando se analiza cociente GSH/GSSG en sangre en cada uno de los géneros (machos  $p=0.037$ , hembras  $p=0.007$ ) vemos que los resultados son similares al análisis global. Cuando se analiza si existen diferencias en los niveles de GSH/GSSG en sangre entre sexos no se detectaron diferencias ( $p=0.538$ ).

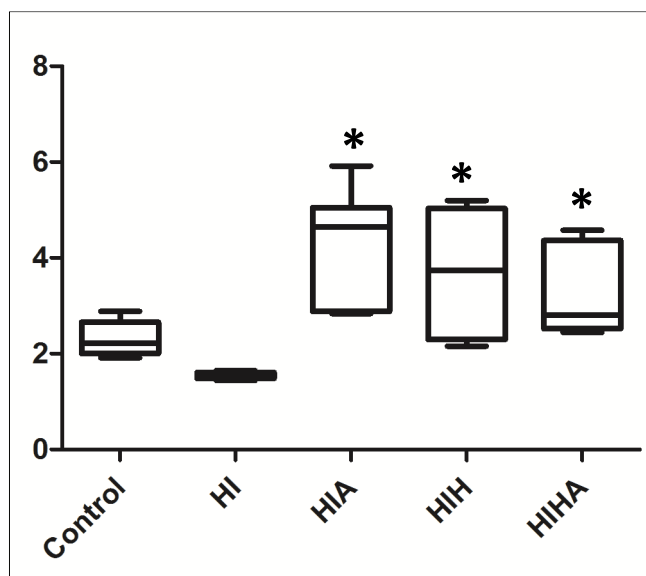
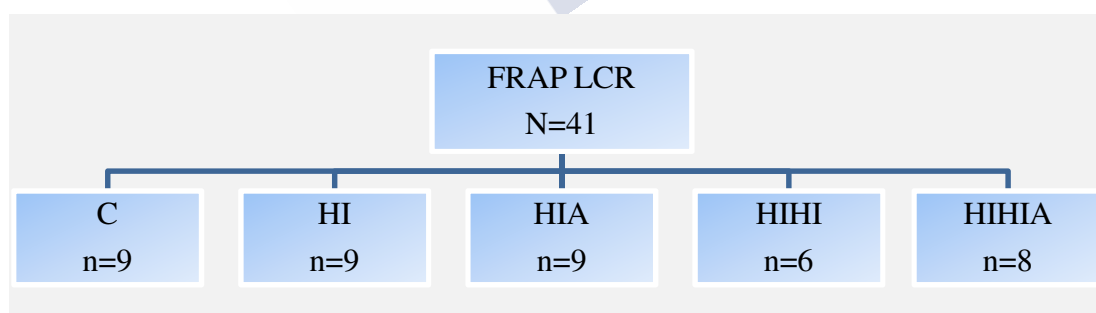


Figura 16. Diagrama de cajas del cociente GSH/GSSG en sangre según condición. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia, HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol, HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia, HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol. \*  $p < 0.05$  en el análisis *post-hoc* de los grupos tratamiento con respecto al grupo HI

#### 4.2 ESTUDIO ANTIOXIDANTE EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Capacidad antioxidante total en líquido cefalorraquídeo (LCR): Método FRAP. Se analizaron los niveles de FRAP en LCR a las 72 horas del evento HI.



Esquema 5. Flujo de animales utilizados para la medición de FRAP en LCR. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia, HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol, HIHI: Hipoxia-isquemia hipotermia, HIHIA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Tabla 6. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles de FRAP en LCR de cada grupo expresado en mMFeSO<sub>4</sub>. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia, HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol, HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia, HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

FRAP LCR (mMFeSO <sub>4</sub> )		
Grupos	Mediana [IQ95%]	Media(ES)
C	0.837 [0.647-1.07]	0.825 (0.065)
HI	0.533 [0.485-0.601]	0.536 (0.020)
HIA	0.646 [0.588-0.792]	0.679 (0.037)
HIH	0.552 [0.505-0.691]	0.570 (0.028)
HIHA	0.592 [0.51-0.75]	0.622 (0.053)

Los animales del grupo HI presentan unos niveles de FRAP en el LCR más bajos que los demás grupos ( $p=0.011$ ). El grupo de animales tratados con alopurinol (HIA) presenta unos niveles de FRAP en LCR similares a los del grupo control ( $p=0.834$ ). No se observa una recuperación de la capacidad antioxidante total en el LCR en los grupos hipotermia asociado o no al alopurinol respecto al grupo control (HIH  $p=0.009$ , HIHA  $p=0.035$ ). (Ver figura 17).

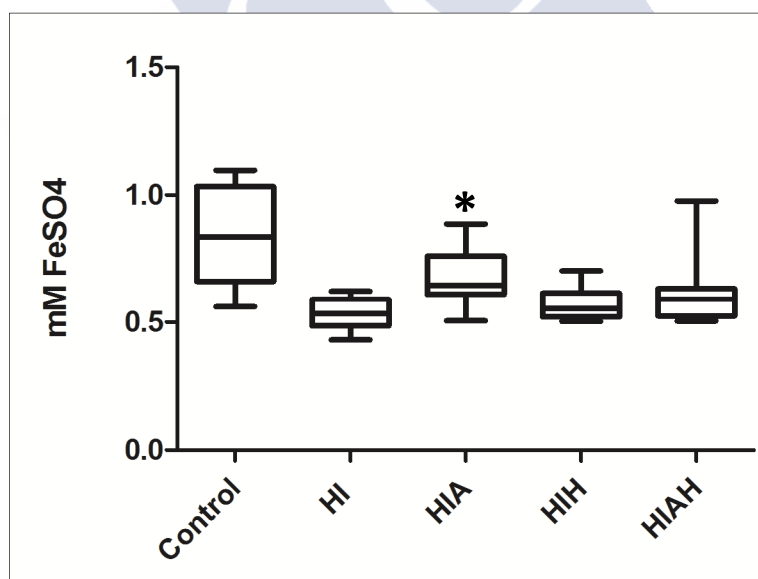
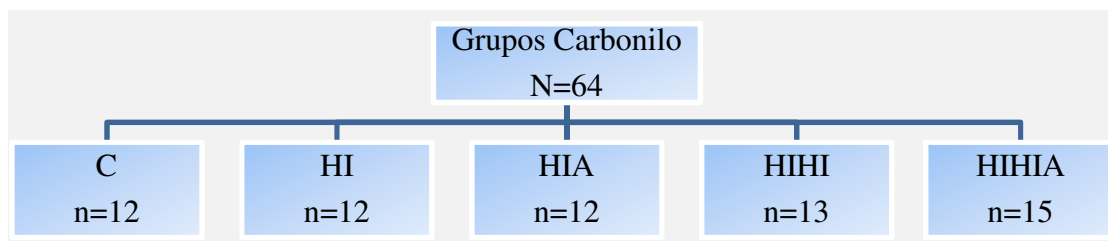


Figura 17. Diagrama de cajas de los niveles de FRAP en LCR según condición. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia, HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol, HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia, HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol. \*  $p<0.05$  en el análisis *post-hoc* de los grupos tratamiento con respecto al grupo HI.

### 4.3 DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS EN SANGRE: GRUPOS CARBONILO

Se analizaron los grupos carbonilo en sangre a las 72 horas del evento HI.



Esquema 6. Flujo de animales utilizados para la medición de daño oxidativo a proteínas en sangre. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Tabla 7. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles de los grupos carbonilo de cada grupo expresado en nmol/gprot. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Grupos carbonilo (nmol/gprot)		
Grupos	Mediana [IQ95%]	Media(ES)
C	1,29 [1.06-1.67]	1.317 (0.10)
HI	3.25 [2.83-3.94]	3.372 (0.19)
HIA	1.71 [1.35-1.91]	1.670 (0.095)
HIH	1.89 [1.559-2.186]	2.011 (0.15)
HIHA	1.82 [1.77-1.99]	1.87 (0.043)

Los niveles de grupos carbonilo en los animales del grupo HI se encuentran significativamente elevados ( $p < 0.001$ ). En el análisis intergrupo se observa como los grupos tratamiento (HIA, HIH, HIHA) presentan menores niveles de grupos carbonilo en comparación con el grupo HI ( $p < 0.001$ ). (Ver figura 18).

En cuanto al análisis por sexo, cuando se analizan los grupos carbonilo en sangre en cada uno de los géneros (machos  $p < 0.001$ , hembras  $p < 0.01$ ) vemos que los resultados son similares al análisis global. Cuando se analiza si existen diferencias en los niveles de los grupos carbonilo en sangre entre sexos no se detectaron diferencias ( $p = 0.632$ ).

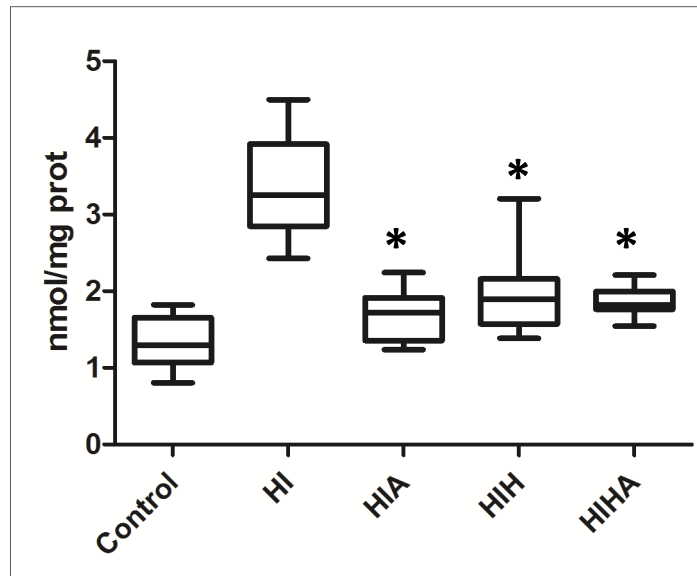
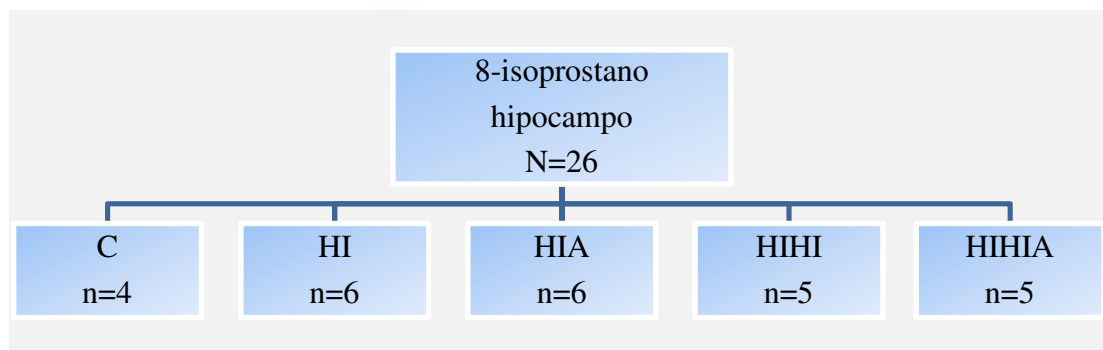


Figura 18. Diagrama de cajas de los niveles de grupos carbonilo en sangre según condición. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol. \*  $p < 0.05$  en el análisis post-hoc de los grupos tratamiento con respecto al grupo HI

#### 4.4 DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS EN TEJIDO CEREBRAL

Se analizaron los niveles de F2-isoprostanos (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ) en hipocampo y zona córtico-subcortical a las 72 horas del evento HI.

##### 4.4.1 Niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ) en hipocampo



Esquema 7. Flujo de animales utilizados para la medición de daño oxidativo a lípidos en tejido de hipocampo. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Tabla 8. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles de los niveles de isoprostanos en tejido de hipocampo de cada grupo expresado en pg de isoprostanos/ mg de proteína.

8-Isoprostano hipocampo (pg/mg de proteína)		
Grupos	Mediana [IQ95%]	Media(ES)
C	1.27 [1.21-1.54]	1.328 (0.75)
HI	1.41 [1.39-2.46]	1.618 (0.19)
HIA	1.48 [1.13-1.70]	1.446 (0.95)
HIH	1.14 [1.1-1.19]	1.147 (0.17)
HIHA	1.36 [1.16-1.67]	1.395 (0.96)

Al analizar los niveles de 8-isoprostano en tejido del hipocampo se detecta que hay diferencias significativas entre los grupos ( $p=0.030$ ), siendo estas diferencias poco evidenciadas en el análisis *post-hoc*. (Ver figura 19).

En cuanto al análisis por sexo, cuando se analizan los niveles de 8-isoprostano en tejido del hipocampo en cada uno de los géneros (machos  $p= 0.034$ , hembras  $p=0.258$ ) vemos que los resultados son similares al análisis global. Cuando se analiza si existen diferencias en los niveles de 8-isoprostano en tejido del hipocampo entre sexos no se detectaron diferencias ( $p=0.191$ ).

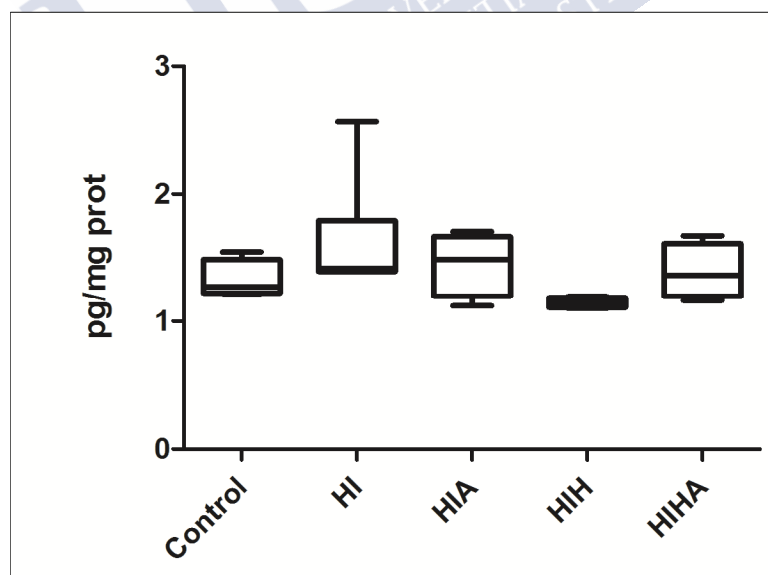
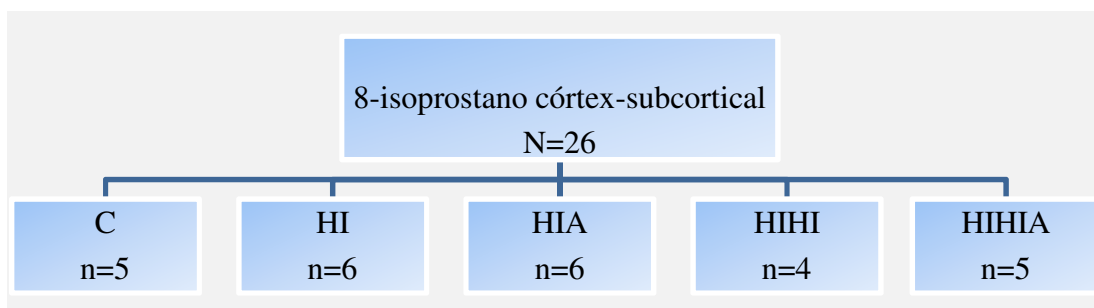


Figura 19. Diagrama de cajas de los niveles de F8-isoprostanos en tejido de hipocampo según condición. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

#### 4.4.2 Niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) en córtex



Esquema 8. Flujo de animales utilizados para la medición de daño oxidativo a lípidos en tejido del córtex-subcortical. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Tabla 9. Mediana [rango intercuartil] y media (error estándar) de los niveles de los niveles de 8-isoprostanos en tejido del córtex-subcortical de cada grupo expresado en pg de isoprostanos/ mg de proteína. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

8-isoprostanos córtex (pg/mg de proteína)		
Grupos	Mediana [IQ95%]	Media(ES)
C	1.64 [1.25-2.02]	1.680 (0.186)
HI	2.92 [2.17-3.43]	2.831(0.224)
HIA	2.23 [1.40-2.44]	2.098 (0.163)
HIH	1.41 [1.07-1.78]	1.423 (0.187)
HIHA	1.82 [1.47-2.14]	1.851 (0.120)

En relación con los niveles de 8-isoprostano en zona córtico-subcortical, existe un incremento significativo de los mismos en el grupo HI ( $p=0.002$ ) y se observa que los animales que recibieron tratamiento con hipotermia (HIH) o combinado (HIHA), los niveles de 8-isoprostano son significativamente menores que con respecto al grupo HI ( $p<0.001$  y  $p=0.013$ , respectivamente). (Ver figura 20).

En cuanto al análisis por sexo, cuando se analizan los niveles de 8-isoprostano en zona córtico-subcortical en cada uno de los géneros (machos  $p=0.034$ , hembras  $p=0.258$ ) vemos que los resultados son similares al análisis global. Cuando se analiza si existen diferencias en los niveles de 8-isoprostano en zona córtico-subcortical entre sexos no se detectaron diferencias ( $p=0.979$ ).



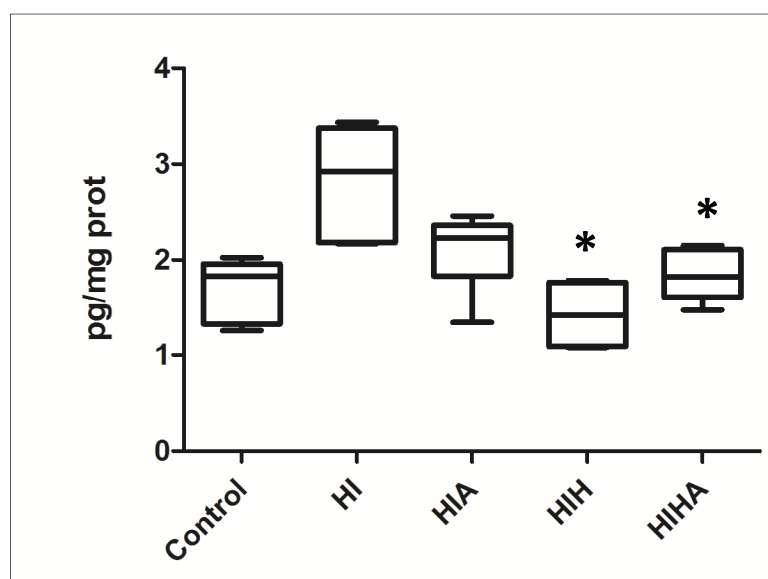


Figura 20. Diagrama de cajas de los niveles de F8-isoprostanos en córtex en cada condición tratada. Abreviaturas: C: Control, HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol. \*  $p < 0.05$  en el análisis post-hoc de los grupos tratamiento con respecto al grupo HI.





# 5

## Discusión

---



## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 DISCUSIÓN DEL MÉTODO

#### 5.1.1 Modelo de daño hipóxico-isquémico en cría de rata

El conocimiento del daño cerebral perinatal ha ido avanzado de manera extraordinaria gracias en parte, al desarrollo de modelos animales que mimetizan la situación de hipoxia-isquemia (HI) y lesión cerebral que se produce en un recién nacido tras un evento HI. Encontrar un modelo único e idóneo es una tarea difícil. El cerebro del recién nacido se encuentra en pleno desarrollo y en él acontecen de forma simultánea cambios bioquímicos, vasculares y celulares, todos ellos variables en función de la edad gestacional y las circunstancias ambientales de cada momento (26). Este periodo de la vida se caracteriza por ser muy dinámico y esto requiere que los modelos animales que quieran mimetizarlo sean diversos, con el objetivo de ajustarse lo mejor posible a sus características diferenciales. Un ejemplo de ello son las diferencias que pueden presentarse entre el daño cerebral del niño prematuro o el que acontece en el niño a término (26,185).

Tal y como quedó reflejado en la “*Third Hershey Conference on Developmental Cerebral Blood Flow and Metabolism*” (186), cada especie animal tiene algo que ofrecer en el ámbito de la investigación, tanto desde el punto de vista madurativo, como del tamaño del animal o de la posibilidad de realizar sobre él diferentes manipulaciones. Cada especie tiene sus pros y sus contras y será esencial escoger el mejor modelo para la pregunta que nos hagamos. A pesar de que no hay ningún modelo que replique exactamente lo que acontece en el recién nacido tras un evento HI, la investigación animal es una herramienta que nos aporta información muy valiosa sobre los mecanismos de daño cerebral, así como de posibles estrategias terapéuticas que podrían mejorar el pronóstico de los niños con esta patología tan discapacitante en algunos casos.

Como hemos mencionado anteriormente, el modelo animal de encefalopatía hipóxico isquémica (EHI) neonatal más utilizado es el de roedor (187). Y es en este modelo en el que más se ha estudiado la fisiopatología del daño cerebral tras un evento HI. El menor coste para su mantenimiento con respecto a otros animales de mayor tamaño y su supervivencia, hacen de él un modelo asequible y de gran utilidad para las evaluaciones a largo plazo. Hasta el año 1997 solo un 29% de los estudios publicados valoraban algún tipo de seguimiento más allá de las 24 horas del evento HI (188). Con el tiempo se ha hecho patente la necesidad de realizar valoraciones cognitivas, motoras y de comportamiento, objetivándose en estudios

experimentales de EHI, alteraciones a largo plazo tanto a nivel cognitivo como motor (189–192). Otro punto importante de las evaluaciones a largo plazo en los modelos animales, es que permite valorar el efecto de las terapias estudiadas sobre el desarrollo neurológico (188).

Las principales limitaciones que tiene este modelo animal es la gran variación que se puede dar en el tamaño de la lesión así como la imposibilidad de una monitorización adecuada de algunas variables fisiológicas (32). Tal y como describen los autores del modelo de Rice-Vannucci, para reducir la variabilidad en la severidad de la lesión, es importante que la temperatura de los animales sea constante a lo largo del procedimiento y que la exposición a la hipoxia se realice dentro de las 2-4 horas siguientes a la ligadura de la carótida (con el fin de que todas las crías puedan amamantar y no más tardíamente porque ello disminuiría el grado de lesión). Otro punto a controlar es el tamaño de la camada, considerándose apropiada aquella con un máximo de 10 crías (193). La debilidad del modelo con respecto a la lesión para algunos autores es también una fortaleza, ya que consideran que la variabilidad de las lesiones refleja lo que ocurre realmente en la práctica clínica con los niños afectados de EHI (31).

#### 5.1.1.1 Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica de Rice-Vannucci

La mayor parte de los estudios de EHI neonatal en ratas utilizan el modelo de Rice-Vannucci (20). Levine y colaboradores describieron una técnica donde sometían a las ratas adultas a una hipoperfusión cerebral asociada a una hipoxia, creando así una lesión HI (22). Para ello, se ligaba la arteria carótida común derecha. Esta ligadura se realizaba externamente en el cuello y por lo tanto a ciegas, buscando con ello que fuese un procedimiento rápido con la posibilidad de desligar y restaurar la circulación. La mayoría de los animales presentaba el síndrome de Horner y la aparición de esta lesión confirmaba el éxito del procedimiento. Después de la cirugía, los animales eran expuestos a un ambiente hipóxico (6-10% de O<sub>2</sub>) hasta que perdían el conocimiento (máximo 40 minutos). Vannucci y colaboradores utilizaron esta misma técnica para desarrollar el primer modelo de EHI neonatal (13). Para ello utilizaron animales de 7 días de vida (p7). En cuanto a la ligadura unilateral de la carótida, se empezó a realizar bajo visualización directa, evitando el clampaje de la yugular y del nervio recurrente. Después de recuperarse de la cirugía, los animales eran sometidos a una hipoxia (8% oxígeno) mientras se mantenían en un ambiente termoestable (temperatura constante de 37°C).

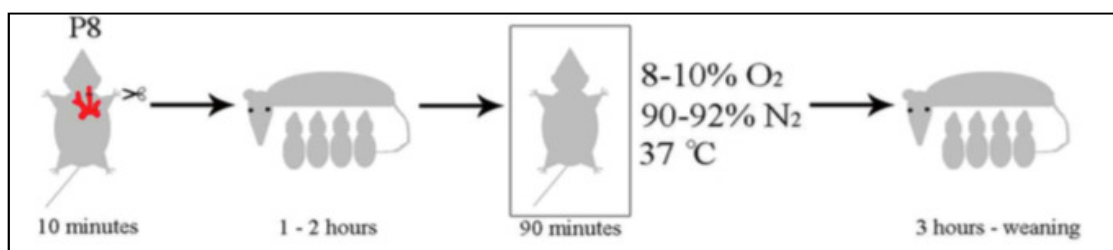


Figura 21. Modelo de Rice-Vannucci. Dibujo extraído del artículo de Millar y colaboradores (14). Licencia Creative Commons.

Utilizando este método, el 90% de los animales desarrollan un daño isquémico moderado-severo en el hemisferio ipsilateral de la ligadura, principalmente en el territorio de la arteria cerebral media con afectación de la sustancia gris (córtex, hipocampo, tálamo y ganglios de la base). En este modelo, es inusual que se afecte el hemisferio contralateral y nunca se observa en aquellos animales que son sometidos a hipoxia sin ligadura (24). Es importante tener en cuenta que la ligadura de la carótida sola sin hipoxia no produce este tipo de lesión ya que el flujo se compensa a través del polígono de Willis (194). En el trabajo original la lesión se observaba a las 50 horas del evento, aunque posteriormente otros estudios describen su aparición en menos tiempo (en 1-2 horas post-HI) (195). En cuanto a la sustancia blanca, también está descrita su afectación (14,196,197) siendo mayor cuanto más severa es la HI (196).

El grado de lesión conseguida con este modelo abarca un amplio espectro pasando de moderado a severo (194), en forma de necrosis neuronal selectiva (glía, respetando los vasos sanguíneos) o infarto (198). A mayor duración de la hipoxia, mayor severidad y extensión de las lesiones cerebrales. Tiempos más cortos de hipoxia se traducen en lesiones a nivel del córtex y del hipocampo, mientras que tiempos más largos se asocian a lesiones cavitarias (por pérdida de sustancia) y afectación de la sustancia blanca subcortical y periventricular (199). Desde el punto de vista metabólico, con este modelo de EHI se producen una serie de alteraciones cerebrales que incluyen el descenso del flujo sanguíneo, la acidosis y la disminución de glucosa. También existen trabajos que han demostrado la aparición de una respuesta inflamatoria (14).

Por todo ello, cuando se realiza un trabajo experimental de daño HI neonatal, es importante considerar todos los factores descritos: tipo de cirugía, tiempo y el grado de hipoxia, temperatura a la que se realiza la intervención, así como edad del animal, ya que estos factores van a influir en el modelo de daño HI, así como el tipo y el grado de lesión que se obtienen en él.

#### 5.1.1.2 Daño hipóxico-isquémico: técnica quirúrgica

Se han realizado diferentes modificaciones de la técnica quirúrgica propuesta por Rice-Vannucci con el objetivo de mimetizar diferentes tipos de daño cerebral neonatal:

- Modelo de leucomalacia periventricular: la ligadura bilateral de la arteria carótida común sin hipoxia en ratas prematuras se ha utilizado para reproducir un patrón de lesión en la sustancia blanca similar a lo que acontece en el niño prematuro (200,201).
- Modelo isquemia-reperfusión focal cerebral neonatal: la oclusión transitoria de la arteria cerebral media en crías de rata permite reproducir experimentalmente el accidente cerebrovascular neonatal (202,203). Existen también como modelo de isquemia-reperfusión la ligadura permanente de la arteria cerebral media izquierda asociada a la ligadura transitoria de la arteria carótida común izquierda (204).
- Modelo EHI: de la técnica de Rice-Vannucci existen trabajos donde la ligadura de la arteria carótida común se realiza tanto del lado derecho como del lado izquierdo

(20,134,205–208). También están descritas otras variaciones quirúrgicas tales como la ligadura bilateral de la arteria carótida común que tenía como objetivo buscar una afectación cerebral global más similar a lo que ocurre en el niño con EHI. Así, Schawrz y colaboradores obtuvieron en ratas p7 un infarto neocortical mayor y más uniforme, aunque sin describir la mortalidad más allá de las 72 horas (30). También Recker y colaboradores realizaron esta técnica en ratas p10 consiguiendo diferentes grados de lesión (leve, moderada, severa) aunque sin poder demostrar una correlación entre la duración de la hipoxia y la severidad del daño (209). Recientemente, algunos autores han propuesto una modificación en el modelo de Rice-Vannucci que consiste en añadir a la ligadura de la carótida común, la ligadura de la carótida externa con el fin de disminuir el flujo retrógrado que se produce a través de la misma durante la intervención (210).

#### 5.1.1.3 Daño hipóxico-isquémico: tiempos de hipoxia, temperatura y edad del animal

Para conseguir distintos grados de lesión, los principales parámetros a modificar son la temperatura y el tiempo de hipoxia. Existen trabajos que describen que con la reducción del tiempo de hipoxia (8%) a 90 minutos a una temperatura de 36°C se consigue una menor mortalidad (16%) (31) y un grado de **daño cerebral moderado** (un 50-60% de lesión si se utiliza un score neuropatológico validado (107) y un 40% si el análisis del daño se realiza a partir de cortes cerebrales de imágenes digitalizadas (31) ).

Para obtener un **daño cerebral severo**, son necesarios tiempos de hipoxia más prolongados (150 minutos) a mayor temperatura (37°C). Con ello, la mortalidad asciende al 28% (31). Otros estudios también describen que manteniendo la temperatura a 36°C y con 150 minutos de hipoxia también se obtiene un daño severo (211).

En trabajos experimentales donde se quiere obtener un **daño cerebral leve** se han utilizado tiempos menores de hipoxia, 50 minutos y temperatura de 36°C (212).

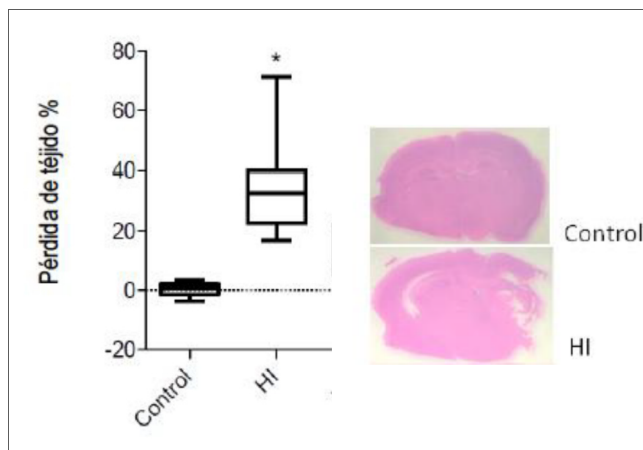
Estudios como el de Yager y colaboradores apoyan la importancia que tiene la temperatura durante la realización del evento HI, reduciéndose la lesión cerebral en hipotermia moderada cuando se compara con la realización de la misma técnica a igual tiempo a una temperatura de 37°C (213).

Otro dato importante en cuanto al grado de hipoxia necesario para provocar una lesión HI es el grado de inmadurez cerebral. Las crías de rata extremadamente prematuras (p1, p2) precisan mayor severidad y mayor tiempo de hipoxia que las prematuras tardías (p7) y presentan además un mayor daño en la sustancia blanca subcortical que las p7 (214).

En nuestro trabajo, basándonos en la literatura revisada y con el objetivo de reproducir un modelo de EHI que se asemeje a la situación que acontece en el recién nacido, decidimos someter a los animales a una técnica ampliamente utilizada por diversos grupos de investigación (31,165,215,216) que incluye la ligadura de la arteria carótida común izquierda y un ambiente hipóxico al 8% durante 90 minutos a una temperatura entre 36-37°C. Con esta intervención obtuvimos un grado de lesión (% de área infartada en el hemisferio isquémico)



que se sitúa sobre el 33.60% ( $\pm 3.30$ ) (120) (Ver figura 22), porcentaje similar al descrito por otros autores (31,165,217), con una mortalidad 9.7%.



**Figura 22.** Tamaño infarto hipóxico-isquémico a las 72 horas post-evento HI. Gráfica que representa el porcentaje de área infartada tras la intervención hipóxico-isquémica de Rice-Vannucci en comparación con el grupo control. Cortes histológicos con tinción hematoxilina-eosina del grupo control y del grupo hipóxico-isquémico. Acrónimo: HI: Hipóxico-Isquémico. Datos extraídos de la publicación realizada por nuestro grupo, Rodríguez-Fanjul y colaboradores (120).

### 5.1.2 Edad gestacional en el modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica

El grado de maduración en el que se encuentra el cerebro en el momento del evento HI condicionará como ya hemos comentado, entre otros factores, las características y grado de lesión que se produzca.

Siendo conscientes de las diferencias tanto en la velocidad de crecimiento/maduración como en el tamaño del cerebro del roedor con respecto al humano, para poder realizar una comparación del modelo animal que utilicemos es imprescindible conocer su desarrollo cerebral y así ajustarnos lo más fielmente posible a la situación que queremos reproducir (218).

Desde el punto de vista madurativo, las crías de rata que se utilizan en la mayoría de las publicaciones con el modelo de Rice-Vannucci de EHI neonatal son crías del día p7, edad que se corresponde a las 32-36 semanas de gestación en humanos. Esta correlación tiene su base en los estudios histológicos, donde se ha evidenciado que a esta edad la estratificación neuronal cortical está completa, la matriz germinal está involucionando y comienza ligeramente la mielinización de la sustancia blanca (193). Está descrito que los eventos HI afectan de manera diferente al cerebro según su grado de maduración (prematureo o término) porque la vulnerabilidad de las regiones cerebrales a la HI se modifica con la edad (33). Estudios experimentales sobre maduración del córtex nos muestran que entre los días p10-p13 las ratas presentan un patrón electroencefalográfico comparable con el que se puede detectar en recién nacidos con una edad gestacional de 40-42 semanas (219,220). Es en este grupo de

pacientes, a término, en los que también se ha detectado una mayor vulnerabilidad del hipocampo a la HI (221).

Es por ello que para mimetizar el daño en el recién nacido a término y las consecuencias de éste a nivel fisiopatológico y neuroconductual algunos autores recomiendan que los trabajos en modelos animales con roedores se realicen en crías de ratas día p10 (33,222). A pesar de ello, que tengamos conocimiento, son escasos todavía el número de trabajos realizados tanto en modelo de HI como de isquemia/reperfusión neonatal a la edad de p10 (108,209,223,224).

En nuestro trabajo para extrapolar la respuesta del tratamiento neuroprotector utilizamos ratas de día p10 con el objetivo de aproximarnos lo máximo posible al tipo de lesión, así como a la maduración cerebral del recién nacido a término.

### 5.1.3 Hipotermia en modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica

La EHI es una enfermedad con secuelas devastadoras para el recién nacido. Actualmente la única estrategia demostrada que reduce la morbimortalidad es la hipotermia moderada sostenida (109,111). Este efecto neuroprotector de la hipotermia también se ha demostrado en diferentes modelos animales de EHI (188): ratas (107,225–227), ovejas (228,229) y cerdos (230,231). A pesar de ello, esta protección no es completa, ya que la hipotermia puede no ofrecer beneficios en los casos severos o una mejoría en las evaluaciones cognitivas a largo plazo (109,114).

#### 5.1.3.1 Grado de enfriamiento

Ante la evidente eficacia de este tratamiento, la comunidad científica se ha planteado si incrementado la profundidad, tiempo de enfriamiento o ambos, ésta popular estrategia neuroprotectora podría tener mayor efectividad (232). Shankara y colaboradores elaboraron un ensayo clínico para responder a esta pregunta y observaron una mayor mortalidad en los grupos en los que se había prolongado el tiempo de hipotermia (120 horas) y/o disminuido la temperatura objetivo (32°C). Por lo que, con los conocimientos actuales, y la evidencia existente, las recomendaciones en niños con EHI candidatos al tratamiento con hipotermia, siguen siendo una duración de 72 horas manteniendo una temperatura de 33°C-34°C (233).

Apoyando estos datos, estudios en modelos experimentales en cerdos no observaron mejoría al reducir la temperatura a 30°C (8.5 °C por debajo de la temperatura basal del animal), detectando además, un empeoramiento de la lesión en tálamo, putamen y núcleo caudado en los animales sometidos a esta temperatura (234). Incluso en este trabajo de Alconada y colaboradores, la reducción de 3.5°C con respecto a la temperatura basal, ofrecía la misma neuroprotección que la reducción de 5°C.

En cuanto a la prolongación del tiempo de hipotermia hasta 120 horas, trabajos en ovejas reportaron un efecto deletéreo, disminuyendo la supervivencia neuronal en algunas áreas del cerebro (córtex y *gyrus dentatus*) (235).

En la misma línea, en el modelo de EHI en rata tampoco se observaron beneficios de un sobreenfriamiento (por debajo de 30°C) demostrándose también una asociación con una mayor morbilidad (236). Actualmente, a raíz de los estudios publicados, se cree que el rango óptimo de hipotermia a nivel experimental, oscila entre los 2-6°C por debajo de la temperatura basal del individuo (237).

La mayoría de publicaciones, sugieren que en el modelo de rata en el día p7, se considera normotermia una temperatura de 37°C (107,238), evidenciándose neuroprotección con la aplicación de un enfriamiento a 32°C (107,165). En el trabajo realizado por Wood y colaboradores, reportan que la neuroprotección con hipotermia, tiene un perfil de actuación en forma de U, evidenciándose una mejoría histológica en los grupos que reciben un enfriamiento a 33.5°C, 32°C y 30°C, pero con un empeoramiento, cuando la temperatura disminuye por debajo de los 30°C. Asimismo, parece existir un punto óptimo de neuroprotección en el hipocampo de aquellos individuos sometidos a 33.5°C y 32°C cuando se compara con animales sometidos a 30°C (236). También estos autores presentaron un estudio de la temperatura basal de los animales en función de la edad, detectando diferencias según la madurez del animal, siendo la media de los controles de las ratas p7 de 35.4°C y la media de temperatura de las ratas p10 de 36°C.

Existen múltiples trabajos que evidencian una buena neuroprotección en el modelo de Rice-Vannucci aplicando un enfriamiento de 32°C (rectal) durante 5 horas tras el evento HI (31,107,165). A nuestro conocimiento, hasta la fecha, sólo Patel y colaboradores (2013) utilizaron un modelo de EHI de ratas equivalentes a la edad de a término (p10) en el que aplicaron hipotermia inmediatamente después del evento HI (menor igual 32°C durante 4 horas) demostrando que esta estrategia confiere neuroprotección protección con efectos clínicos a corto y largo plazo.

#### 5.1.3.2 Tiempo de inicio de la hipotermia

Otro punto importante, es el momento óptimo para iniciar el tratamiento con hipotermia. Las guías clínicas recomiendan su inicio antes de las 6 horas de vida, basándose en modelos experimentales (228,229). Sabir y colaboradores estudiaron la ventana terapéutica de la hipotermia en crías de rata y al igual que en los trabajos de Gunn, detectaron que la mayor neuroprotección acontece cuando ésta se aplica de forma inmediata tras el evento HI (31). También reportaron que la aplicación de la hipotermia dentro de las primeras 6 horas tiene un efecto beneficioso en los casos de EHI moderada, pero no en los casos de EHI severa, tal y como con otras estrategias neurprotectoras ya se ha evidenciado. Con respecto a un inicio más tardío de la terapia en los niños con EHI candidatos a la hipotermia, Laptook y colaboradores sugieren que la aplicación entre las 6-24 horas de vida podría tener algún efecto beneficioso (239), aunque menor que en los pacientes en los que se aplica durante la ventana terapéutica.

En base a la literatura referida, en nuestro trabajo se aplicó la hipotermia a 32°-33°C durante 5 horas e iniciada a los 15 minutos del evento HI. Las crías de rata que no se sometieron a hipotermia se mantuvieron con una temperatura rectal de 36-37°C.

#### **5.1.4 Alopurinol como agente neuroprotector en la encefalopatía hipóxico-isquémica**

Las sustancias antioxidantes poseen la capacidad de actuar neutralizando los radicales libres. Éstos contribuyen a frenar la reacción en cascada resultante del aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras un episodio de isquemia-reperusión. Por ello, la búsqueda de terapias antioxidantes se ha convertido en uno de los puntos claves en la investigación de tratamientos coadyuvantes a la hipotermia (240).

El alopurinol tiene, entre otras funciones, la capacidad de neutralizar los radicales libres, disminuir la formación de superóxido y actuar como quelante del hierro libre (121,124,125). Por todas estas características fue uno de los primeros fármacos en plantearse como tratamiento neuroprotector en casos de EHI (140–143,241), situación clínica en la que el estrés oxidativo juega un papel muy importante. Las primeras aplicaciones en estudios experimentales por Palmer, demostraron que su administración 30 minutos antes del episodio de hipoxia en ratas del día p7 implicaba un efecto neuroprotector, disminuyendo el edema y el tamaño de la lesión cerebral (133). En la misma línea, este grupo evidenció también una disminución del daño cerebral agudo y a largo plazo cuando administraba el fármaco 15 minutos tras el evento HI (134). Su efecto neuroprotector también se ha evidenciado en otros modelos animales (123). Sin embargo, aunque el alopurinol parece que puede tener efectos beneficiosos en la EHI moderada, por el momento no se ha podido demostrar claramente su papel neuroprotector cuando se ha aplicado en recién nacidos afectados de EHI (242).

Existen muchas hipótesis sobre el por qué de los resultados obtenidos en pacientes. Un punto importante y esencial parece ser el tiempo (momento) de administración del fármaco en la EHI, ya que su mecanismo de acción, sugiere que cuánto más precoz sea su administración, más beneficiosos podrían ser sus efectos (131). Como mencionamos previamente, una de las ventajas que ofrece la administración prenatal del alopurinol es la precocidad del tratamiento, persiguiendo con ello la disminución en la formación de radicales libres que se generan tras la fase de reperusión en un evento HI. Sin embargo, esta forma de administración tiene una limitación importante: la dificultad para predecir qué fetos presentarán una EHI tras el nacimiento sin tener que sobretratar a las madres ni a los niños. Otra limitación en este tipo de administración la encontramos en que pueden existir casos de partos inminentes donde no se llegue a tiempo de alcanzar los niveles terapéuticos de alopurinol.

También hay diferentes opciones con respecto a la dosis utilizada, Itoh y colaboradores determinaron que se precisaban dosis mayores de 100 mg/kg para observar un efecto neuroprotector (243). A raíz de este estudio el grupo de Palmer utilizó una dosis de 130-138 mg/kg, ya que este volumen se podía administrar de forma subcutánea sin producir hemorragias a ese nivel, situación que sí se observaban si se utilizaban dosis mayores (133).

Con el objetivo de conseguir una aplicación farmacológica precoz y basándonos en los estudios de Palmer, en nuestro trabajo se decidió que la administración del alopurinol fuese de 135 mg/kg a los 15 minutos del evento HI.

Que conozcamos hasta la fecha, no existen estudios experimentales publicados que evalúen el efecto sobre el estrés oxidativo del tratamiento combinado hipotermia con alopurinol en un modelo de EHI neonatal. Actualmente, se ha iniciado un ensayo clínico

multicéntrico internacional que pretende evaluar la eficacia de la terapia conjunta (hipotermia + alopurinol) en niños.

### 5.1.5 Métodos de evaluación del estrés oxidativo

Con el objetivo de valorar si los tratamientos hipotermia, alopurinol o la combinación de ambos aminoran la cascada de estrés oxidativo que se produce tras un episodio HI, realizamos la determinación de los niveles de antioxidantes no enzimáticos, el daño oxidativo a proteínas y el daño oxidativo a lípidos.

#### 5.1.5.1 Métodos para medir la capacidad antioxidante total

El estado antioxidante refleja el balance entre el sistema antioxidante y los prooxidantes. La medición de la actividad antioxidante de las sustancias presentes en una muestra se conoce como capacidad antioxidante total (TAC), término cuestionado en algunas revisiones que sugieren que se denomine capacidad antioxidante no enzimática (244).

Las moléculas antioxidantes pueden actuar mediante la transferencia de átomos de hidrógeno o mediante la transferencia de electrones. La medición del estado antioxidante de manera global surge debido a la dificultad que existe para medir los antioxidantes de forma individualizada. A lo largo de los años se han ido desarrollando diversos métodos para la cuantificación de la TAC en muestras biológicas (245), sin que haya, por el momento, un consenso que nos defina cual de ellas debe ser el “*gold standard*”. Dentro de los métodos para evaluar la TAC, existe una división, considerándose pruebas directas, las miden la capacidad para inhibir una especie oxidante y pruebas indirectas, los métodos en los que se utiliza una especie oxidante que induce un daño oxidativo y se valora la capacidad de los compuestos antioxidantes para reducirlo. (Ver figura 23).

La técnicas más utilizadas en plasma son los métodos FRAP y ABTS (TEAC), siendo ambos métodos indirectos, espectrofométricos y de transferencia de electrones (246–248).

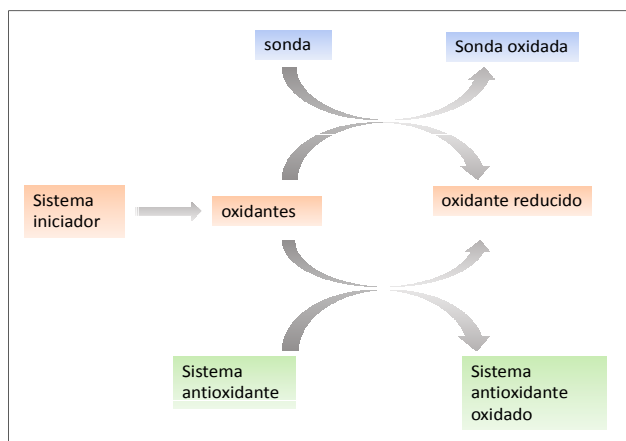
El método ABTS/TEAC (capacidad antioxidante de equivalentes al trolox) se fundamenta en la inhibición por parte de los agentes antioxidantes de la absorción del radical catión  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato) y se caracteriza por su aplicabilidad para el estudio de antioxidantes tanto liposolubles como hidrosolubles (248).

El método FRAP (capacidad antioxidante para reducir el ion férrico) fue desarrollado por Benzie y Strain (182). Mide la capacidad antioxidante necesaria para reducir el complejo formado por el cromógeno TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina) y el hierro férrico ( $\text{Fe}^3\text{-TPTZ}$ ) a un complejo ferroso ( $\text{Fe}^2\text{-TPTZ}$ ). Su poder para reducir el hierro se interpreta como un reflejo de la capacidad para reducir especies reactivas de oxígeno. Una de las limitaciones de esta técnica es que no valora uno de los antioxidantes más importantes, el glutatión (GSH) (249).

Estos métodos se han utilizado para la medición en sangre de los sistemas antioxidantes y se caracterizan por ser métodos sencillos, rápidos y poco costosos y nos ofrecen una idea

global de la actividad antioxidante de diversos componentes, con las limitaciones que esto también conlleva. Se consideran tests de laboratorio que pueden contribuir a la valoración general del estrés oxidativo, complementada con otras técnicas (244).

Existen diversos estudios experimentales que han utilizado la medición de la capacidad antioxidante total en modelo de EHI neonatal y de isquemia cerebral global en ratas (250–253).



**Figura 23.** Esquema del funcionamiento de los métodos de capacidad antioxidante. Se utiliza una especie oxidante y se cuantifica la oxidación de la sonda. Cuanto mayor sea la capacidad antioxidante menor será la oxidación de la sonda. Imagen de elaboración propia.

#### 5.1.5.2 Cuantificación de los niveles de GSH y cociente GSH/GSSG

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido con efecto protector frente a las especies reactivas del oxígeno. Es el principal antioxidante no enzimático del organismo y juega un papel muy importante en la protección del daño oxidativo eliminando radicales libres del medio mediante su conjugación generando su forma oxidada reversible (GSSG). La medición de GSH en sangre puede reflejar el estatus de GSH en otras zonas del organismo menos accesibles. Se ha descrito, tanto en estudios animales como en humanos, la alteración en los niveles de GSH y en la relación GSH/GSSG en diversas patologías (254) y ha sido considerado un indicador útil del estado redox en todo el organismo (255). La disminución de los valores de GSH así como el cociente GSH/GSSG son indicadores de estrés oxidativo en el cerebro isquémico y se ha observado que el daño isquémico empeora cuando aplicamos una depleción farmacológica de GSH (256). Algunas de las limitaciones para la medición de GSH son disponibilidad de su precursor (las cisteínas) y la utilización de distintos métodos para su cuantificación y sus posibles artefactos (254).

En nuestro estudio los niveles totales de glutatión fueron determinados utilizando el método de Griffith (183). La medición de GSH así como de el cociente GSH/GSSG constituye una técnica ampliamente utilizada para el estudio del estrés oxidativo tanto a nivel clínico como experimental (250,252,257–259).



### 5.1.5.3 Determinación de grupos carbonilo

Los radicales libres pueden lesionar las proteínas modificando su configuración. Algunas de estas modificaciones son irreversibles dando lugar a la pérdida o a la disminución de la función biológica de la proteína. Existen diversos métodos para cuantificar el daño proteico secundario al estrés oxidativo, uno de ellos es la medición de los grupos carbonilo (GC). La carbonilación proteica constituye un ejemplo de daño oxidativo irreversible en la proteína. Los grupos carbonilo (GC) pueden generarse por diferentes mecanismos, destacando entre ellos, el mecanismo de oxidación de los aminoácidos lisina, prolina, treonina y arginina (260). La determinación de los GC constituye uno de los biomarcadores de estrés oxidativo más ampliamente utilizado (261), debido a que se genera relativamente rápido y presenta una buena estabilidad química en comparación con otros compuestos oxidados (255).

En nuestro estudio, el método que utilizamos para su determinación fue el desarrollado por Levine y colaboradores (184), que se basa en la reacción equimolecular de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas. La DNFH unida a proteínas se cuantifica espectrofotométricamente tras la separación de las proteínas desnaturalizadas por precipitación con un ácido y su posterior solubilización con guanidina. Esta medición de los GC también se puede realizar por técnicas de inmunoensayo como ELISA o Western Blot. La medición de los GC después de la desnaturalización con DNFH es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la oxidación proteica (262). Existen un gran número de trabajos que utilizan la medición de los GC para el estudio del estrés oxidativo (263–267).

### 5.1.5.1 Determinación de isoprostanos

Los lípidos constituyen otras de las moléculas diana de los radicales libres. La peroxidación lipídica se describe como un proceso donde moléculas oxidantes atacan a los lípidos que contienen doble enlace carbono-carbono, especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados (268).

Dentro de los productos de peroxidación lipídica se encuentran los F2-isoprostanos (F2-IsoPs). Éstos son compuestos similares a las prostaglandinas (*PG-like*) que contienen un anillo de prostano tipo F y que se forman independientemente de las enzimas COX, a partir de la peroxidación no enzimática catalizada por radicales libres del ácido araquidónico esterificado (269). Después de su generación, éstos son liberados a la circulación por fosfolipasas. Los F2-IsoPs se caracterizan por ser muy estables y con baja reactividad, por lo que su medición se considera una herramienta muy fiable para valorar el daño oxidativo a lípidos (270). Su especificidad y su presencia en todos los tejidos/fluidos permite tener valores normales de referencia y han hecho de ellos, unos de los mejores biomarcadores de peroxidación lipídica *in vivo* (271). Dentro de los F2-isoPs, el 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  es el más representativo (272). Algunos trabajos como el estudio “Biomarkers of Oxidative Stress Study” (BOSS) (273) sugirieron que la medición del F2-isoPs en plasma o en orina es uno de los métodos más precisos para cuantificar *in vivo* el estrés oxidativo (274). Trabajos como el

estudio caso/control de Vento y colaboradores apoyan el considerar los isoprostanos como potencial biomarcador en sangre de cordón de los recién nacidos con EHI (275).

En nuestro estudio se utilizó para su medición en tejido la técnica de inmunoensayo ELISA (OxiSelect™ 8- iso-Prostaglandin F2 $\alpha$  ELISA Kit). La determinación de los niveles de F2isoPs ya ha sido referenciada en diversos trabajos que estudian el estrés oxidativo (270,275–277).

## 5.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo presentado en esta tesis forma parte de un proyecto que tiene como objetivo determinar el papel neuroprotector de la hipotermia asociada al alopurinol en un modelo animal de EHI.

La primera parte del proyecto utilizó el mismo modelo de encefalopatía hipóxica isquémica (EHI) moderada (ratas del día postnatal 10, hipoxia-isquemia (HI) mediante el método Rice-Vannucci y aleatorización en 5 grupos: Control, HI, HIA, HIH, HIHA para realizar una valoración clásica del daño cerebral. Se determinó el efecto neuroprotector de la terapia estudiada, analizando el grado de lesión desde el punto de vista *i) histológico* (área del infarto y score neuropatológico a las 72 horas del evento HI); *ii) bioquímico* (determinación de los niveles de caspasa 3 activada a las 24 horas del evento HI); *iii) funcional* en dos fases, una temprana (valoración motora) mediante el test geotáxico y una a largo plazo (memoria témporo-espacial) mediante un laberinto acuático de Morris. De los resultados obtenidos, ya publicados por nuestro grupo (120) destacan que el área global de infarto fue significativamente menor en los grupos que recibieron tratamiento (HIH, HIHA, HIA), mientras que el volumen del hipocampo se mantenía también mayor en estos grupos ( $p < 0.001$ ). El análisis del *score* neuropatológico fue estadísticamente diferente entre los grupos ( $p = 0.001$ ) y la estructura histológica se encontraba mejor preservada en los grupos hipotermia e hipotermia más alopurinol (HIH y HIHA).

A nivel molecular también los grupos tratados presentaban unos niveles más bajos de caspasa 3 activada, sin detectarse diferencias entre los grupos que recibieron tratamiento con hipotermia (HIH) o hipotermia más alopurinol (HIHA) con respecto al grupo control.

A nivel funcional, todos los grupos que habían recibido tratamiento presentaron mejores resultados que los animales HI en la prueba geotáxica. Con respecto a la evaluación cognitiva, los animales que no recibieron tratamiento neuroprotector (HI) aprendieron más lentamente y tuvieron una curva de aprendizaje diferente al resto de los grupos. Los animales que fueron tratados con alopurinol exclusivamente (HIA) aprendieron de forma más rápida que los del grupo HI pero peor que los del grupo control y los HIH y HIHA.

Uno de los puntos más interesantes de esta primera parte fue que al analizar los resultados por género, objetivamos diferencias en la respuesta al tratamiento antioxidante en función del sexo. Las hembras presentaban una mejoría más evidente al recibir alopurinol, ya fuese solo (HIA) o en administración conjunta con la hipotermia (HIHA). Esto se evidenciaba con una disminución del daño histológico, una disminución de la caspasa 3 activada, una recuperación casi completa en la prueba funcional y una mejor curva de aprendizaje que los machos en las



hembras de los grupos HIA e HIHA. Con estos datos, concluimos que la terapia combinada hipotermia+alopurinol confiere una buena neuroprotección cuando se administra en un modelo animal de EHI (menores niveles de caspasa 3 activada a las 24 horas del evento HI, mejor score neuropatológico con menor tamaño del infarto y mejor preservación del hipocampo a las 72 horas del evento HI, mejores resultados en la evaluación funcional y cognitiva con respecto a los animales HI que no recibieron tratamiento). Así mismo, nuestros resultados sugieren que las terapias que actúan inhibiendo la vías de muerte celular dependientes de la vía caspasa, presentan mejores resultados en hembras, especialmente aquellas terapias que son antioxidantes como el alopurinol.

A partir de estos resultados, y como segunda parte del proyecto, nos propusimos evaluar la afectación de los sistemas antioxidantes tras un evento HI así como su posible mejora tras la aplicación de tratamientos neuroprotectores (hipotermia y alopurinol). Para ello analizamos el efecto de esta terapia sobre diferentes aspectos del metabolismo oxidativo, desde la capacidad antioxidante total y el antioxidante glutatión (para dar una visión de global de cómo puede verse afectados los sistemas antioxidantes), hasta la oxidación de proteínas y lípidos.

### **5.2.1 Sistemas antioxidantes: evaluación tras un evento hipóxico-isquémico y efecto de las terapias neuroprotectoras**

Los sistemas antioxidantes forman parte de los mecanismos con los que cuenta nuestro organismo para defenderse del exceso de radicales libres.

Está descrito que tras un episodio de isquemia-reperfusión cerebral aumentan las sustancias oxidantes con el consecuente consumo de los sistemas antioxidantes. En el recién nacido, esta situación se ve todavía más acentuada por la relativa deficiencia de estos sistemas en el periodo neonatal (103).

Estudios en los que se ha realizado la manipulación genética de los sistemas antioxidantes, han demostrado su importancia en la modulación del daño cerebral perinatal (57). Ann Sheldon y colaboradores basándose en la hipótesis de que en el cerebro neonatal hay una menor actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) y por lo tanto una menor eliminación del radical peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), demostraron que la sobreexpresión de la glutatión peroxidasa humana<sup>1</sup> tiene un efecto neuroprotector, disminuyendo la lesión histológica en los ratones p7 sometidos a un evento HI (103). He y su grupo también señalaron el papel protector de estos sistemas, observando que la administración de la enzima CuZnSOD disminuye el volumen del infarto cerebral (278).

### 5.2.1.1 Capacidad Antioxidante total

***La capacidad antioxidante total en sangre disminuye en el grupo HI mientras que en el grupo de tratamiento combinado (hipotermia + alopurinol) sus niveles se mantienen.***

Al analizar la capacidad antioxidante total (TAC) en sangre observamos que ésta disminuye de forma significativa en los animales HI respecto a los que no reciben tratamiento. Nuestros resultados van acordes con publicaciones recientes que demuestran una disminución de la TAC en el tejido cerebral de ratas p7 afectas de EHI (251,252). En la misma línea, Simone N. Weis y colaboradores, determinaron que tras un evento HI no se produce un aumento de las enzimas catalasa ni glutatión peroxidasa, enzimas que son imprescindibles para la correcta eliminación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (198). Todos estos datos ponen en evidencia que después de un evento HI la capacidad antioxidante total se altera, confiriendo tal vez, más vulnerabilidad al daño cerebral.

En nuestro estudio los grupos que reciben tratamiento neuroprotector presentan unos niveles de TAC en sangre similar a los del grupo control. Esta medición se realizó mediante 2 métodos (FRAP y ABTS) y observamos que los niveles de FRAP se conservan en el grupo tratado con hipotermia (HIH) y que los niveles de ABTS se conservan en los grupos que reciben alopurinol (HIA). En el caso del grupo combinado hipotermia+alopurinol (HIHA), se mantuvieron los niveles tanto de FRAP como de ABTS. Esta recuperación o mantenimiento de los niveles de TAC en los grupos que han recibido tratamiento apoya la hipótesis que la hipotermia asociada o no a una terapia antioxidante modula al alza o mantiene en niveles normales los marcadores utilizados de TAC.

#### ***Alopurinol y su efecto sobre la capacidad antioxidante total en sangre***

Revisando en la literatura el posible efecto del alopurinol sobre la TAC en la EHI, Van Bel y colaboradores, en 1998 publicaron un estudio donde incluyeron recién nacidos afectados de EHI a los que se administró Alopurinol 170 min después del evento HI (placebo n=11, alopurinol n=11, 2 dosis de alopurinol a 40 mg/kg ev). Al contrario que en nuestro trabajo, ellos detectaron una disminución mantenida, aunque sin significación estadística, de la TAC desde las 16-20 horas post-evento HI hasta el tercer día, sin observar una normalización de los niveles de antioxidantes (medido por TRAP) en relación con la administración del alopurinol. Incluso los niveles de TAC en el día 2 fueron significativamente más bajos en el grupo alopurinol que en el placebo. Su hipótesis para estos resultados, fue que esta disminución de la capacidad antioxidante en plasma observada en los niños que recibieron alopurinol podría deberse a que este grupo presentaba una menor concentración de ácido úrico y dado que éste es un importante antioxidante, quizás pudo afectar a los niveles de TAC. También sugerían que el tiempo de administración del Alopurinol pudo influir en sus resultados (140).

En el trabajo de Van Bel la primera dosis se administraba sobre los 170 minutos desde el evento HI, tal vez un poco tarde para intervenir en la cascada prooxidante inicial que acontece después de un evento HI. En nuestro trabajo, la administración de la terapia antioxidante es

mucho más precoz, a los 15 minutos del mismo, pudiendo influir sobre los resultados que hemos obtenido. Como todas las terapias antioxidantes, es esencial su administración de forma muy precoz para frenar las cascadas del metabolismo oxidativo, seguramente su administración más tardía pudo haber contribuido a la ausencia de normalización de la capacidad antioxidante a pesar del tratamiento con el alopurinol.

Los estudios experimentales han demostrado que, aunque la producción de radicales libres se inicia en la fase de isquemia, su incremento más importante ocurre tras la fase de reperusión cerebral con un pico de producción máxima a los 10 minutos de la restauración del flujo, continuando la formación de radicales libres hasta horas después del evento HI (279).

La xantina oxidasa (XO) es una de las principales fuentes de producción de superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), con un pico máximo a los 30 minutos del evento HI (280,281). El superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) además, tiene un papel importante como generador de otros radicales libres en presencia de sustancias prooxidantes. El alopurinol, así como su metabolito oxipurinol, se ha descrito como inhibidor de la XO pero también como un eliminador por sí mismo de radicales libres como el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) (124) y como quelante del hierro libre no unido a proteínas (NBPI) (125,140). En el trabajo de Ono y colaboradores se demuestra como el pre-tratamiento con alopurinol, especialmente a dosis altas (200  $\mu\text{g/g}$ ), en un modelo de isquemia/reperusión cerebral en rata, atenúa la formación de superóxido (280). Considerando nuestros resultados en plasma, creemos que una administración precoz/inmediata del alopurinol tras un evento HI, puede ser igual de efectiva que la administración pre-evento a la hora de disminuir la formación de radicales libres, siendo esta disminución de radicales libres la que conlleva a una mejor conservación de los niveles de antioxidantes.

### ***Hipotermia y su efecto sobre la capacidad antioxidante total en sangre***

En cuanto al efecto que tiene la hipotermia sobre el estrés oxidativo, diversos trabajos experimentales con distintos modelos de daño cerebral han demostrado su protección frente a éste (253,282–284). Los mecanismos específicos de cómo la hipotermia confiere neuroprotección todavía no están claramente definidos, pero parece que su aplicación reduce el metabolismo cerebral, disminuye la liberación de aminoácidos excitatorios y evita en gran parte la formación de  $\bullet\text{NO}$  y superóxido (115,285). Aunque existen controversias en este tema con algunos estudios que sugieren que la hipotermia podría incrementar el estrés oxidativo (286). Estas discrepancias observadas podrían ser secundarias a los diferentes modelos animales utilizados, así como las diferencias en el grado de enfriamiento, ya que una disminución excesiva de la temperatura genera estrés celular y es fuente de producción de ROS (282).

En relación al efecto que tiene la hipotermia concretamente sobre los sistemas antioxidantes, en nuestro estudio observamos que los animales del grupo hipotermia (HIH) presentan unos niveles sanguíneos de TAC (medidos por FRAP) similares a los del grupo control. Estos resultados van en concordancia con otras publicaciones que demuestran el efecto beneficioso de la hipotermia en la HI sobre los sistemas antioxidantes. Lei Li y colaboradores en su modelo de isquemia cerebral global en ratas, observaron como la

hipotermia ( $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ ) mejoraba los niveles de ABTS en el hipocampo (neuronas CA1) con respecto al grupo HI (253). En la misma línea Toader y colaboradores en un modelo de EHI en ratas p7, detectaron que el tratamiento con hipotermia aumentaba de forma muy significativa la enzima antioxidante SOD cuando se comparaba con el grupo HI (287), resultados que también se evidenciaron en trabajos en modelo porcino (282).

También en otros modelos de daño isquémico (parada cardiorespiratoria y traumatismo cerebral), la hipotermia moderada produjo un aumento de las enzimas antioxidantes estudiadas en los grupos que recibieron tratamiento (282,284).

Con respecto a la terapia conjunta hipotermia+alourinol, en nuestro estudio observamos que este grupo (HIHIA) mantienen los niveles de TAC, tanto medidos por FRAP como por ABTS, en relación con el grupo control. Que conozcamos, hasta la fecha no existen publicaciones evaluando el efecto de este tratamiento combinado sobre los sistemas antioxidantes.

***El tratamiento con alopurinol mantiene la capacidad antioxidante total en el líquido cefalorraquídeo tras un evento HI sin evidenciarse este efecto cuando se administra conjuntamente con la hipotermia.***

La medición de la TAC en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se realizó mediante el método FRAP, siendo el volumen de muestra insuficiente para el análisis adicional de ABTS. Observamos en nuestro estudio que el único grupo que presenta unos niveles de TAC similares al grupo control es aquel que recibe alopurinol (HIA), evidenciándose una afectación de los niveles de TAC en los grupos HI y en los tratados con hipotermia sólo o asociada al alopurinol (HIH, HIHA).

El alopurinol es un fármaco que atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica (BHE). Palmer y colaboradores determinaron que este fármaco alcanza el pico en plasma a los 30 minutos de su administración (134). En este estudio de Palmer, los niveles de alopurinol a nivel cerebral fueron aproximadamente un cuarto de los niveles pico en sangre. Asimismo, Shadid y colaboradores observaron cómo la administración terapéutica del alopurinol en corderos, tras un episodio de HI, disminuía de forma significativa los niveles de NBPI en córtex en comparación con el grupo placebo, apoyando nuevamente que el alopurinol atraviesa la BHE (125).

La BHE permite regular el tránsito de sustancias entre la sangre y el cerebro, asegurando en condiciones fisiológicas, un adecuado aporte de nutrientes (288). Su disrupción da lugar a una alteración funcional y estructural de sus componentes (289). Existen algunas situaciones en las que la permeabilidad de la BHE puede verse alterada como en casos de EHI, meningitis o traumatismos, y este aumento es mayor cuanto mayor es el grado de afectación (289–291). Numerosos trabajos de daño cerebral han demostrado que la aplicación de la hipotermia tiene un efecto protector sobre la BHE (292–296). Uno de los mecanismos propuestos como efecto protector de ésta sobre la BHE es la capacidad de inhibir la activación de las proteasas, responsables de la degradación de la matriz extracelular (295). Además, la hipotermia actúa sobre diversas proteínas y células, manteniendo su estabilidad y preservando así la morfología vascular y la homeostasis del agua cerebral, lo que reduce el edema cerebral y el daño

secundario (297,298). Este efecto estabilizador de la hipotermia sobre la BHE se mantiene hasta varios días después de su cese (296). Algunos trabajos como el estudio publicado por Jin, J. S. y colaboradores demostraron que la hipotermia puede afectar al transporte de fármacos a través de la BHE (Glucoproteína-P1), reflejando la importancia de las variaciones farmacocinéticas de algunas drogas cuando se utilizan en combinación con la hipotermia (299).

El mecanismo protector de la hipotermia sobre la BHE podría ser la clave de que en nuestro modelo de EHI neonatal, los niveles de antioxidantes en los grupos que reciben hipotermia, ya sea sola o asociada al alopurinol (HIH, HIHA), estén disminuidos y solo los que reciben alopurinol (HIA), así como los controles, mantengan los niveles de FRAP. Con esta teoría, nuestros resultados apoyan nuevamente la hipótesis de que el alopurinol debe administrarse de forma muy precoz, incluso antes del inicio de la hipotermia, ya que ésta podría frenar su difusión a través de la barrera hematoencefálica.

Con ello nuestro trabajo ha demostrado que el alopurinol tiene un papel en la protección de la capacidad antioxidante total, pero que éste puede verse disminuido a nivel cerebral si se aplica la hipotermia de forma coadyuvante. También parece que la administración precoz del alopurinol es esencial para que la terapia tenga su efecto.

#### 5.2.1.2 GSH y cociente GSH/GSSG

Como mencionamos anteriormente, el glutatión (GSH) es uno de los sistemas antioxidantes más abundantes del organismo y un importante agente detoxificante. Niveles bajos de GSH se asocian con un mayor acúmulo de ROS en los tejidos y a cambios en el potencial celular redox (103). Además, se ha descrito en estudios de cultivos neuronales *in vivo*, que su disminución puede producir daños a nivel mitocondrial.

Su situación ideal en el organismo es aquella en la que predomina en su forma reducida (GSH), manteniendo bajos sus niveles en la forma oxidada (GSSG). El índice GSH/GSSG es de gran utilidad para la monitorización del daño oxidativo y como reflejo del estado celular redox (257). Se han reportado niveles elevados de GSSG en la sangre de cordón de los recién nacidos con hipoxia periparto, apoyando la idea de que existe un estado prooxidante tras una episodio HI (257).

***Los niveles de GSH y el cociente GSH/GSSG se ven disminuidos tras un evento HI, normalizándose en los grupos que reciben tratamiento.***

En nuestro estudio se observa una disminución significativa de los niveles de GSH así como de la relación GSH/GSSG en el grupo HI. Estos datos van acordes con los resultados de otras publicaciones (259), apoyando la hipótesis de que ante una situación de HI se produce una liberación masiva de radicales libres que consumen la forma reducida del antioxidante glutatión. Sin embargo, aquellos grupos que reciben tratamiento post-evento HI, presentan niveles significativamente mayores tanto de GSH como de la relación GSH/GSSG. Destaca que el grupo alopurinol es aquel con los niveles más elevados, incluso mayores que los controles.



### ***Alopurinol y su efecto sobre el antioxidante endógeno GSH***

El papel del alopurinol como normalizador de los niveles de GSH también está descrito en trabajos experimentales de isquemia/reperfusión de fallo renal agudo (300,301) y de obstrucción parcial ureteral (grupo alopurinol en comparación con grupo placebo). Jenkinson y colaboradores describieron en un modelo experimental de síndrome de distrés respiratorio, un aumento de GSH a nivel pulmonar en el grupo tratado con alopurinol, así como una mayor actividad enzimática de la SOD y de la catalasa, aunque esta última no fue significativa (302).

A pesar de que existen muchos estudios sobre las acciones del alopurinol y sus beneficios en distintos modelos de isquemia/reperfusión, su mecanismo de acción sobre el sistema antioxidante ha sido relativamente poco estudiado. El mantenimiento de los niveles de GSH y del índice GSH/GSSG podría deberse a un menor consumo del GSH gracias a una mayor eliminación y disminución de las ROS por parte del alopurinol. Quizás otro campo por explorar y que hipotetizamos, es la posibilidad de que el alopurinol juegue un papel como inductor en la expresión del GSH, al igual que ocurre con otras sustancias antioxidantes como la melatonina, la cual produce una “*up-regulation*” de las enzimas antioxidantes (303) y que este hecho justificase la elevación/protección especialmente significativa de los niveles GSH que detectamos en el grupo alopurinol.

### ***Hipotermia y su efecto sobre el antioxidante GSH***

En relación al efecto de la hipotermia sobre el antioxidante glutatión, parece que ésta ejerce un efecto conservador sobre el mismo. Estudios *in vivo* en ratas muestran que la aplicación de frío preserva los niveles de GSH en sangre y en el hígado (órgano principal para la síntesis y exportación de GSH al plasma) (304). Esta acción de la hipotermia se observa también en estudios experimentales y clínicos de parada cardiorespiratoria así como en modelos de isquemia cerebral, donde los niveles de GSH aumentan en los individuos a los que se les aplica la hipotermia moderada en comparación con los que se mantienen en normotermia (305–307).

Los resultados de nuestro estudio apoyan el efecto protector de la hipotermia, del alopurinol y de su administración conjunta sobre el antioxidante glutatión tras un evento HI. Esta mejoría en los niveles de GSH se confirman también con un mayor índice GSH/GSSG en comparación con los individuos HI, reflejo de un menor daño oxidativo en los grupos que reciben tratamiento.

## **5.2.2 Evaluación del daño oxidativo a proteínas tras un evento hipóxico-isquémico y valoración del efecto de las terapias neuroprotectoras**

Las ROS generadas tras un evento HI tienen un gran potencial de lesión ya que son susceptibles de dañar a una gran variedad de moléculas tales como el DNA, RNA, lípidos, proteínas, carbohidratos y antioxidantes (308). Por ello, uno de los métodos que se utiliza para evaluar el estrés oxidativo es la medición de la oxidación proteica. Esta oxidación que sufren

las proteínas dará lugar a la pérdida de su función y como consecuencia final a la alteración y muerte celular.

El daño que producen las ROS sobre las proteínas puede ser a través de radicales libres como superóxido, hidroxil, peroxil, alcoxil, hidroperoxil y especies no radicales, entre otras, el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito (262).

La oxidación proteica se considera un importante marcador de estrés oxidativo ya que las proteínas se encuentran de forma abundante en células, plasma y tejidos, y son una de las principales dianas de los radicales libres (309). Estudios en recién nacidos con hipoxia demuestran una elevación de la oxidación proteica, especialmente en los niños prematuros (310,311).

Existen diversos métodos para cuantificar el daño proteico secundario al estrés oxidativo, como mencionamos previamente, uno de ellos es la medición de los grupos carbonilo (GC). Los GC se producen en las cadenas laterales de las proteínas cuando éstas se oxidan por efecto de las ROS. Los GC también se generan por otros mecanismos como la escisión oxidativa de proteínas y su formación se puede producir en presencia de metales de transición, de hecho, Perrone y colaboradores demostraron una correlación directa entre el hierro libre no unido a proteínas (NBPI) y la carbonilación proteica (265).

***La oxidación proteica se encuentra aumentada tras un evento HI y disminuye en los grupos que reciben tratamiento neuroprotector.***

En nuestro estudio se observa un aumento significativo de los GC en el grupo HI con respecto al grupo control, apoyando lo descrito en la literatura.

La oxidación proteica en el contexto de la EHI ha sido demostrada tanto a nivel clínico como experimental (264,276,308). Así, trabajos en modelo porcino detectan una elevación de los GC ya a las 3 horas del evento HI (264). Parece además, que el nivel de oxidación proteica aumenta cuanto mayor es el grado de EHI, tal y como refleja el estudio de Simona Negro y colaboradores (276). Este grupo detectó mayores niveles de productos de oxidación proteica (AOPP) en los niños con EHI severa en comparación con aquellos con EHI leve/moderada, así como una asociación entre la oxidación proteica y la severidad del daño cerebral (a mayor AOPP mayor severidad en el MRI).

En otros modelos de daño isquémico cerebral también queda reflejado que existe un daño proteico y que además, persiste durante varios días. Yamaguchi y colaboradores en su modelo de isquemia-reperfusión en ratón, observaron que la oxidación proteica alcanzaba niveles máximos a las 8 horas y que se mantenían elevados hasta las 96 horas de la perfusión (312). En este trabajo también se evaluó el efecto del alopurinol administrado 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico, sin evidenciar una mejoría de este parámetro. En nuestra muestra, sin embargo, recibir tratamiento tanto con hipotermia (HIH) como con alopurinol (HIA) o con ambos (HIHA), sí parece proteger frente a la oxidación proteica.

### ***Hipotermia y su efecto sobre la oxidación a proteínas***

Si revisamos en la literatura el papel de la hipotermia sobre la oxidación proteica, estudios experimentales de HI realizados en cerdos muestran cómo la aplicación de este tratamiento disminuye la carbonilación proteica a las 3 y 6 horas del evento HI (173,264). Esta disminución, sin embargo, no se observa en todos los trabajos, como es el caso de Barata y colaboradores donde analizaron las muestras más tardíamente, a las 54 horas del evento HI (266). Estos autores refieren que sus resultados son acordes a lo publicado en la literatura, donde las diferencias en los marcadores de estrés oxidativo no se aprecian a partir de las 9 horas de un evento HI severo en cerdos (313). Otro factor que podría haber contribuido a la ausencia de beneficio de la hipotermia en este estudio fue la elevada mortalidad que tuvieron tras el procedimiento HI, siendo, por lo tanto, un modelo de EHI de daño severo (266).

En nuestro trabajo a pesar de que el análisis de la muestra se realiza a las 72 horas del evento HI, sí que observamos un efecto protector de la hipotermia sobre las proteínas, pero a diferencia del grupo de Barata, nuestro modelo genera un daño HI moderado.

### ***Alopurinol y su efecto sobre la oxidación proteica***

Con respecto al alopurinol, el mecanismo exacto por el que éste actúa sobre la oxidación proteica no es bien conocido, a pesar de que existe bibliografía que apoya su papel protector como en casos de enfermedad cardíaca (314). Ante los resultados que obtuvimos en los grupos que recibieron alopurinol, hipotetizamos un posible mecanismos de acción de éste fármaco basándonos en cómo se generan los GC: estudios de EHI observan un aumento precoz del peroxinitrito ( $H_2O_2$ ) a las 3 y 6 horas del evento HI (259), éste se forma a partir de la combinación no enzimática del óxido nítrico (NO) con el superóxido ( $\bullet O_2^-$ ). Se ha visto que el peroxinitrito aumenta de forma dosis dependiente los niveles de GC (315) y por ello nos planteamos que quizás el alopurinol con su efecto inhibidor del superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), impediría que se formase el peroxinitrito ( $H_2O_2$ ) en grandes cantidades disminuyendo secundariamente la formación de GC.

### **5.2.3 Evaluación del daño oxidativo a lípidos tras un evento hipóxico-isquémico y valoración del efecto de las terapias neuroprotectoras**

Otra de las importantes consecuencias del daño oxidativo sobre el organismo es la peroxidación lipídica, esto se debe a que los ácidos grasos presentes en las membranas celulares son muy vulnerables a las ROS (316). Tanto trabajos experimentales como estudios clínicos demuestran un aumento de la oxidación a lípidos tras un episodio de hipoxia y/o isquemia (317–319).

***La oxidación a lípidos se ve aumentada tras un evento HI y disminuye en los grupos que reciben tratamiento neuroprotector.***

En nuestro estudio se analizaron los niveles de F2isoprostanos (F2-IsoPs), concretamente 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ , tanto en el hipocampo como en la zona córtico-subcortical por ser estructuras



cerebrales particularmente vulnerables a la HI. En ambas estructuras observamos diferencias significativas entre los grupos, sugiriendo una protección antioxidante en aquellos individuos que recibieron tratamiento. En el hipocampo no pudimos evidenciar diferencias en el análisis intergrupo, siendo probablemente necesario aumentar el número de animales para poder detectarlas. En la zona córtico-subcortical los grupos hipotermia (HIH) y combinado (HIHA) mostraron disminución significativa con respecto al grupo HI.

El aumento de la peroxidación lipídica que hallamos en el grupo HI concuerda con otros estudios de EHI neonatal en ratas (p7) donde evidencian un aumento significativo tanto de los F2-IsoPs como de los neuroprostanos en el córtex (270), así como del biomarcador malondialdehído, en el hipocampo y en el córtex 1-2 horas después de la HI (198). Sin embargo, no en todos los trabajos se ha podido detectar este daño a lípidos tras un evento HI, Garberg y colaboradores en su modelo porcino no observaron diferencias en el análisis de neuroprostanos y neurofuranos urinarios entre los grupos HI y los controles (313). Este grupo achacó sus resultados a que los individuos controles fueron sometidos a anestesia, ventilación mecánica y cirugía, pudiendo esta circunstancia elevar el estrés oxidativo también en ellos.

#### ***Alopurinol y su efecto sobre la peroxidación lipídica***

En relación a otros trabajos que evalúan el alopurinol como tratamiento neuroprotector, no pudieron demostrar que este fármaco administrado pre-intervención tuviese efecto sobre la peroxidación lipídica en un modelo de isquemia/reperfusión cerebral global (312). La dosis administrada en este caso fue de 50 mg/kg vía oral, los autores refieren que esta dosis pudo no ser suficiente para alcanzar propiedades eliminadoras directas de radicales libres. Sin embargo, estudios clínicos cardiovasculares le confieren al alopurinol un papel protector frente a la peroxidación lipídica (320).

#### ***Hipotermia y su efecto sobre la peroxidación lipídica***

El efecto de la hipotermia sobre la peroxidación lipídica no está claramente establecido, existiendo publicaciones en las que se le atribuye un aumento de la oxidación lipídica (304,321) y otras que evidencian un efecto protector (322,323). Recientemente Hunn y colaboradores realizaron diversos trabajos en modelo porcino de EHI donde sí observan una disminución del 8-iso-PGF2 $\alpha$  urinario en el grupo hipotermia aunque sin evidenciar ningún otro cambio, ni en sangre ni en orina, en el resto de los biomarcadores de peroxidación lipídica evaluados (277). Este mismo grupo también analizó parámetros de peroxidación lipídica en córtex, hipocampo y sustancia blanca subcortical y obtuvieron que la hipotermia disminuía en la sustancia blanca 3 de los 4 biomarcadores analizados, incluyendo los F2-IsoPs, pero no pudieron observar esta mejoría ni en el córtex ni en el hipocampo (324). En la misma línea, Bayir y colaboradores en un modelo de traumatismo cerebral en rata tampoco encontraron una disminución de la peroxidación lipídica en córtex, pero sí describieron un descenso de los F2-IsoPs en LCR en los machos sometidos a hipotermia.

En nuestro estudio sí observamos que los grupos que reciben hipotermia, sólo o combinada con alopurinol (HIH, HIHA), presentan una disminución significativa de los F2-

IsoPs (8-iso-PGF2 $\alpha$ ) en el córtex en comparación con el grupo HI. Al igual que Huum y colaboradores, no detectamos diferencias asociadas al sexo. En relación con el hipocampo sí obtuvimos diferencias significativas entre los grupos, aunque sin poder evidenciarlas en el análisis *post-hoc*. Con nuestros datos, creemos que podemos afirmar que hay una protección frente al daño oxidativo en el hipocampo de los grupos tratados (HIA, HIIH, HIIHA) y que esta protección se refleja también en los resultados funcionales obtenidos en nuestro estudio anterior donde estos grupos presentaron mejores puntuaciones en el laberinto acuático de Morris (120).

Desde del punto de vista clínico parece que la hipotermia puede ejercer un cierto efecto protector sobre la oxidación lipídica en los niños afectados de EHI. En estos niños se ha detectado una elevación de los niveles de THP (total hidroperóxidos) durante los primeros días de vida y aunque el tratamiento con hipotermia atenúa esta tendencia ( $p=NS$ ), sigue siendo relevante el estrés oxidativo en este grupo de pacientes, por lo que se hace primordial seguir buscando terapias combinadas que aminoren este daño (118).

Que conozcamos no existen otros trabajos publicados que evalúen el efecto del alopurinol administrado conjuntamente con la hipotermia sobre la peroxidación lipídica. A raíz de nuestros resultados nos planteamos posibles mecanismos de acción de ambos tratamientos utilizados. Sabemos que el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) tiene un papel muy importante en el daño HI y entre otras de sus acciones, altera la BHE desencadenando la peroxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares (325). Como mencionamos anteriormente, estudios experimentales de traumatismo cerebral, así como de HI, demuestran que la hipotermia ayuda a estabilizar la BHE (325) y quizás este mecanismo contrarreste el daño del radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Por otro lado, el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) se genera a partir del superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) y en presencia del hierro. El alopurinol con su efecto quelante del hierro, su acción eliminadora de  $\bullet OH$ , así como inhibidora de la formación del superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), podría contribuir junto a la hipotermia a la disminución de la peroxidación lipídica y al consecuente mantenimiento de la membrana celular.

### 5.3 DIFERENCIAS DE GÉNERO Y TERAPIAS NEUROPROTECTORAS

Para nuestro trabajo hemos utilizado crías de rata de ambos sexos. Existe una creciente evidencia de que los mecanismos de muerte celular tras un evento HI pueden ser variables en función del sexo (194) por lo que la respuesta a las terapias neuroprotectoras también puede variar en función del género. Considerando que en la primera parte de nuestro proyecto, destacó el papel neuroprotector del alopurinol especialmente en hembras, realizamos un análisis por sexo en cada uno de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados, observando que la distribución de los resultados no fue diferente en función del sexo y tampoco hubo diferencias en la respuesta al tratamiento según el sexo. Con estos últimos resultados debemos de ser cautos ya que el número de animales, muy pequeño al tener que subdividir los grupos por sexo, ha podido influir a la hora de no detectar diferencias. La mayor parte de los trabajos que evalúan terapias neuroprotectoras no han reportado la existencia de diferencias en su respuesta en función del género del animal (108,165,231). Pero en los trabajos más recientes

sí que algunos autores han observado un potencial beneficio de algunas terapias en las hembras (107,120), estos hallazgos no se han corroborado en otros estudios (324).

#### **5.4 LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO**

Nuestro proyecto ha utilizado un modelo animal de encefalopatía hipóxico-isquémica, ampliamente referenciado en la literatura, pero al considerar los resultados siempre hay que tener en cuenta las limitaciones que esto conlleva cuando se quieren extrapolar a los niños recién nacidos.

Una de las principales limitaciones técnicas con la que nos hemos encontrado, es el tamaño de los animales. Al ser crías tan pequeñas las muestras de tejidos y fluidos que se obtienen son muy reducidas, siendo imposible en muchos casos analizar más de un marcador de estrés en el mismo animal. Así mismo esto también ha dificultado poder ampliar el estudio con otros marcadores de estrés oxidativo.

Por el mismo motivo, los datos de la valoración de la lesión cerebral a nivel histológico, se ha hecho en base a nuestro trabajo anterior realizado con diferentes crías de rata pero aplicando exactamente el mismo método (120).

#### **5.5 APORTACIONES DE ESTE ESTUDIO**

La experimentación animal ha sido y continua siendo el primer paso para la evaluación del efecto de posibles terapias neuroprotectoras tras un evento HI. Se ha realizado este trabajo con crías de rata del día postnatal p10, equivalentes al recién nacido a término, edad óptima para este modelo de EHI neonatal. Dado que la mayoría de trabajos han utilizado un modelo de crías de rata pretérmino, creemos que nuestro estudio puede aportar información acerca del modelo de EHI en ratas a término. Que conozcamos hasta la fecha, no existen publicaciones evaluando el efecto neuroprotector del tratamiento combinado hipotermia y alopurinol en un modelo de EHI neonatal. Actualmente se ha iniciado un ensayo clínico internacional (The European ALBINO TRIAL) que pretende valorar el efecto de la administración de alopurinol de forma muy precoz, asociado a la hipotermia.





# 6

## Conclusiones

---



## 6 CONCLUSIONES

Nuestro trabajo refuerza la idea de que el cerebro neonatal es muy vulnerable al estrés oxidativo tras un evento hipóxico isquémico (HI). El tratamiento con hipotermia y alopurinol ofrece protección frente al daño oxidativo cuando se administra en un modelo animal de encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI). A raíz de los resultados obtenidos y en concordancia con otras publicaciones, creemos que la hipotermia ofrece un papel estabilizador de la BHE y por tanto la administración del alopurinol debe efectuarse de forma muy precoz para optimizar su papel como antioxidante. Estas reflexiones se sustentan de las siguientes observaciones:

1. Los animales del grupo HI presentan unos niveles de sistemas antioxidantes en sangre y líquido cefalorraquídeo disminuídos en comparación con el grupo control y los grupos que recibieron algún tratamiento.
2. Los animales del grupo HI presentan un incremento en la oxidación de las proteínas en sangre y en los niveles de peroxidación lipídica en tejido cerebral (zona córtico-subortical e hipocampo).
3. Los animales que han recibido tratamiento neuroprotector (alopurinol, hipotermia, hipotermia+alopurinol) presentan un incremento en los sistemas antioxidantes en sangre, especialmente aquellos individuos que han recibido el tratamiento combinado.
4. La administración de alopurinol tras un evento HI incrementa la capacidad antioxidante total en el líquido cefalorraquídeo con respecto al grupo HI. Ni el tratamiento combinado ni la hipotermia tuvieron un efecto protector en este aspecto.
5. La oxidación proteica disminuye en todos los grupos que reciben tratamiento neuroprotector (alopurinol, hipotermia, hipotermia+alopurinol).
6. La peroxidación lipídica en tejido cerebral disminuye en los grupos que reciben hipotermia y tratamiento combinado hipotermia+alopurinol.







# 7

## Bibliografía

---



## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Smith J, Wells L, Dodd K. The continuing fall in incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *BJOG*. 2000;107(4):461-6.
2. Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 1997;100(6):1004-14.
3. Hull J, Dodd KL. Falling incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992;99(5):386-91.
4. Fathali N, Lekic T, Zhang JH, Tang J. Long-term evaluation of granulocyte-colony stimulating factor on hypoxic-ischemic brain damage in infant rats. *Intensive Care Med*. 2010;36(9):1602-8.
5. Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(6):587-95.
6. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(1):CD003311.
7. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr*. 2015;169(4):397-403.
8. The Baby Who Was Depressed at Birth in Neonatal Cerebral Investigation | Request PDF [Internet]. ResearchGate. [citado 15 de febrero de 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/285266532\\_The\\_Baby\\_Who\\_Was\\_Depressed\\_at\\_Birth\\_in\\_Neonatal\\_Cerebral\\_Investigation](https://www.researchgate.net/publication/285266532_The_Baby_Who_Was_Depressed_at_Birth_in_Neonatal_Cerebral_Investigation)
9. Neuroprotección con hipotermia en el recién nacido con encefalopatía hipóxico-isquémica. Guía de estándares para su aplicación clínica [Internet]. [citado 15 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.analesdepediatria.org/es-pdf-S169540331100381X>

10. Executive summary: Neonatal encephalopathy and neurologic outcome, second edition. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Neonatal Encephalopathy. *Obstet Gynecol.* 2014;123(4):896-901.
11. Miller SP, Ramaswamy V, Michelson D, Barkovich AJ, Holshouser B, Wycliffe N, et al. Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. *J Pediatr.* 2005;146(4):453-60.
12. Martínez-Biarge M, Blanco D, García-Alix A, Salas S, Grupo de Trabajo de Hipotermia de la Sociedad Española de Neonatología. [Follow-up of newborns with hypoxic-ischaemic encephalopathy]. *An Pediatr (Barc).* 2014;81(1):52.e1-14.
13. Ferriero DM, Miller SP. Imaging selective vulnerability in the developing nervous system. *J Anat.* 2010;217(4):429-35.
14. Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:78.
15. Charriaut-Marlangue C, Besson VC, Baud O. Sexually Dimorphic Outcomes after Neonatal Stroke and Hypoxia-Ischemia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 26 de diciembre de 2017 [citado 7 de marzo de 2019];19(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796011/>
16. Hill CA, Fitch RH. Sex differences in mechanisms and outcome of neonatal hypoxia-ischemia in rodent models: implications for sex-specific neuroprotection in clinical neonatal practice. *Neurol Res Int.* 2012;2012:867531.
17. Waddell J, Hanscom M, Edwards NS, McKenna MC, McCarthy MM. Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. *Exp Neurol.* 2016;275(0 2):285-95.
18. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev.* 1979;3(1):79-83.
19. Gunn AJ, Thoresen M. Animal studies of neonatal hypothermic neuroprotection have translated well in to practice. *Resuscitation.* 2015;97:88-90.
20. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981;9(2):131-41.
21. Vannucci RC, Lyons DT, Vasta F. Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke.* 1988;19(2):245-50.
22. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960;36:1-17.

23. Grow J, Barks JDE. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clin Perinatol*. 2002;29(4):585-602, v.
24. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol*. 2004;207(Pt 18):3149-54.
25. Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol*. 2004;11(1):31-46.
26. Yager JY, Ashwal S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol*. 2009;40(3):156-67.
27. Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke*. 1998;29(7):1454-60; discussion 1461.
28. Derugin N, Wendland M, Muramatsu K, Roberts TP, Gregory G, Ferriero DM, et al. Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke*. 2000;31(7):1752-61.
29. Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, Osborne TN, Pearce WJ. A new model of neonatal stroke: reversible middle cerebral artery occlusion in the rat pup. *Pediatr Neurol*. 1995;12(3):191-6.
30. Schwartz PH, Massarweh WF, Vinters HV, Wasterlain CG. A rat model of severe neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke*. 1992;23(4):539-46.
31. Sabir H, Scull-Brown E, Liu X, Thoresen M. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke*. 2012;43(12):3364-70.
32. Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev*. 1997;47(2):115-46.
33. Patel SD, Pierce L, Ciardiello AJ, Vannucci SJ. Neonatal encephalopathy: pre-clinical studies in neuroprotection. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(2):564-8.
34. Martin LJ, Brambrink A, Koehler RC, Traystman RJ. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *J Comp Neurol*. 1997;377(2):262-85.

35. Foster KA, Colditz PB, Lingwood BE, Burke C, Dunster KR, Roberts MS. An improved survival model of hypoxia/ischaemia in the piglet suitable for neuroprotection studies. *Brain Res.* 2001;919(1):122-31.
36. Broad KD, Fierens I, Fleiss B, Rocha-Ferreira E, Ezzati M, Hassell J, et al. Inhaled 45-50% argon augments hypothermic brain protection in a piglet model of perinatal asphyxia. *Neurobiol Dis.* 2016;87:29-38.
37. Gunn AJ, Parer JT, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD. Cerebral histologic and electrocorticographic changes after asphyxia in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1992;31(5):486-91.
38. Hagberg H, Andersson P, Kjellmer I, Thiringer K, Thordstein M. Extracellular overflow of glutamate, aspartate, GABA and taurine in the cortex and basal ganglia of fetal lambs during hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett.* 1987;78(3):311-7.
39. Dammann O, Ferriero D, Gressens P. Neonatal encephalopathy or hypoxic-ischemic encephalopathy? Appropriate terminology matters. *Pediatr Res.* 2011;70(1):1-2.
40. McKinstry RC, Miller JH, Snyder AZ, Mathur A, Schefft GL, Almli CR, et al. A prospective, longitudinal diffusion tensor imaging study of brain injury in newborns. *Neurology.* 2002;59(6):824-33.
41. Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci.* 1 de noviembre de 2000;20(21):7994-8004.
42. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH. Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):22368-401.
43. Nuñez A, Benavente I, Blanco D, Boix H, Cabañas F, Chaffanel M, et al. Estrés oxidativo en la asfixia perinatal y la encefalopatía hipóxico-isquémica. *Anales de Pediatría.* 2018;88(4):228.e1-228.e9.
44. Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2009;23(1):59-68; quiz 69-70.
45. Lai M-C, Yang S-N. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:609813.
46. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci.* 1995;18(2):57-8.

47. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W, Zipursky A. The Developing Nervous System: A Series of Review Articles: Neurobiology of Hypoxic-Ischemic Injury in the Developing Brain. *Pediatric Research*. 2001;49:735.
48. Gunn AJ, Laptook AR, Robertson NJ, Barks JD, Thoresen M, Wassink G, et al. Therapeutic hypothermia translates from ancient history in to practice. *Pediatr Res*. 2017;81(1-2):202-9.
49. Wassink G, Gunn ER, Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Front Neurosci*. 2014;8:40.
50. Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*. 2000;5(1):3-16.
51. McLean C, Ferriero D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol*. 2004;28(6):425-32.
52. Bennet L, Tan S, Van den Heuvel L, Derrick M, Groenendaal F, van Bel F, et al. Cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia and cerebral palsy. *Ann Neurol*. 2012;71(5):589-600.
53. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacological neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol*. 2014;41(1):119-31.
54. Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol*. 2005;15(3):234-40.
55. Ichord RN, Johnston MV, Traystman RJ. MK801 decreases glutamate release and oxidative metabolism during hypoglycemic coma in piglets. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001;128(2):139-48.
56. Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science*. 1999;283(5401):496-7.
57. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol*. 2011;10(4):372-82.
58. McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev*. 1990;15(1):41-70.
59. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 1994;12(3):529-40.

60. McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 1988;459(1):200-3.
61. Cohen-Cory S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science.* 2002;298(5594):770-6.
62. Talos DM, Follett PL, Folkerth RD, Fishman RE, Trachtenberg FL, Volpe JJ, et al. Developmental regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. II. Human cerebral white matter and cortex. *J Comp Neurol.* 2006;497(1):61-77.
63. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999;9(1):119-31.
64. Kugler P, Drenckhahn D. Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. *Glia.* 1996;16(2):165-73.
65. Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenzie-Graham A, Dopp JC, Ding M, et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 1997;48(4):372-84.
66. Ferriero DM, Holtzman DM, Black SM, Sheldon RA. Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury. *Neurobiol Dis.* 1996;3(1):64-71.
67. Peeters-Scholte C, Koster J, van den Tweel E, Blomgren K, Hamers N, Zhu C, et al. Effects of selective nitric oxide synthase inhibition on IGF-1, caspases and cytokines in a newborn piglet model of perinatal hypoxia-ischaemia. *Dev Neurosci.* 2002;24(5):396-404.
68. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(3):388-97.
69. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(3):214-20.
70. Beltrán B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14602-7.
71. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995;15(4):961-73.



72. Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA, Martínez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2005;39(1):26-50.
73. Moral Y, Robertson NJ, Goni-de-Cerio F, Alonso-Alconada D. [Neonatal hypoxia-ischemia: cellular and molecular brain damage and therapeutic modulation of neurogenesis]. *Rev Neurol*. 2019;68(1):23-36.
74. Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci*. 2001;23(3):198-202.
75. Hagberg H, David Edwards A, Groenendaal F. Perinatal brain damage: The term infant. *Neurobiol Dis*. 2016;92(Pt A):102-12.
76. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(4):192-208.
77. Okazaki K, Nishida A, Kato M, Kozawa K, Uga N, Kimura H. Elevation of cytokine concentrations in asphyxiated neonates. *Biol Neonate*. 2006;89(3):183-9.
78. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*. 2011;69(5):743-58.
79. Thornton C, Rousset CI, Kichev A, Miyakuni Y, Vontell R, Baburamani AA, et al. Molecular Mechanisms of Neonatal Brain Injury. *Neurol Res Int* [Internet]. 2012 [citado 24 de febrero de 2019];2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3272851/>
80. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(5):e331-339.
81. Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjö BK. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(9):1294-300.
82. Zhu C, Wang X, Deinum J, Huang Z, Gao J, Modjtahedi N, et al. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *J Exp Med*. 2007;204(8):1741-8.
83. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*. 2000;14(5):729-39.
84. Descoux C, Ginet V, Clarke PGH, Puyal J, Truttmann AC. Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy-mediated cell death. *Int J Dev Neurosci*. 2015;45:75-85.

85. Ten VS, Starkov A. Hypoxic-ischemic injury in the developing brain: the role of reactive oxygen species originating in mitochondria. *Neurol Res Int.* 2012;2012:542976.
86. Balduini W, Carloni S, Buonocore G. Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury: evidence and speculations. *Autophagy.* 2009;5(2):221-3.
87. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2011;69(5):743-58.
88. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(4):186-90.
89. Guo M-F, Yu J-Z, Ma C-G. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. *Folia Neuropathol.* 2011;49(2):78-87.
90. Tataranno ML, Perrone S, Buonocore G. Plasma Biomarkers of Oxidative Stress in Neonatal Brain Injury. *Clin Perinatol.* 2015;42(3):529-39.
91. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(8):1505-17.
92. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci.* 2007;27(5):1129-38.
93. Thornton C, Baburamani AA, Kichev A, Hagberg H. Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in the development of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(5):1067-76.
94. Perrone S, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23 Suppl 3:63-5.
95. McLean CW, Mirochnitchenko O, Claus CP, Noble-Haeusslein LJ, Ferriero DM. Overexpression of glutathione peroxidase protects immature murine neurons from oxidative stress. *Dev Neurosci.* 2005;27(2-4):169-75.
96. White AR, Cappai R. Neurotoxicity from glutathione depletion is dependent on extracellular trace copper. *J Neurosci Res.* 2003;71(6):889-97.
97. Rousset CI, Baburamani AA, Thornton C, Hagberg H. Mitochondria and perinatal brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25 Suppl 1:35-8.

98. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12(4):287-95.
99. Perrone S, Tataranno LM, Stazzoni G, Ramenghi L, Buonocore G. Brain susceptibility to oxidative stress in the perinatal period. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28 Suppl 1:2291-5.
100. Johnston MV, Hoon AH. Possible mechanisms in infants for selective basal ganglia damage from asphyxia, kernicterus, or mitochondrial encephalopathies. *J Child Neurol.* 2000;15(9):588-91.
101. Ferriero DM, Sheldon RA, Black SM, Chuai J. Selective destruction of nitric oxide synthase neurons with quisqualate reduces damage after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 1995;38(6):912-8.
102. Sarco DP, Becker J, Palmer C, Sheldon RA, Ferriero DM. The neuroprotective effect of deferoxamine in the hypoxic-ischemic immature mouse brain. *Neurosci Lett.* 2000;282(1-2):113-6.
103. Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Christen S, Vexler ZS, Täuber MG, et al. Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. *Pediatr Res.* 2004;56(4):656-62.
104. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* 2009;8(1):110-24.
105. Back SA. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2017;134(3):331-49.
106. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Cháfer-Pericás C, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.* 2017;12:674-81.
107. Bona E, Hagberg H, Løberg EM, Bågenholm R, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr Res.* 1998;43(6):738-45.
108. Patel SD, Pierce L, Ciardiello A, Hutton A, Paskewitz S, Aronowitz E, et al. Therapeutic Hypothermia and Hypoxia-Ischemia in the Term-equivalent Neonatal Rat: Characterization of a Translational Pre-clinical Model. *Pediatr Res.* 2015;78(3):264-71.
109. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet.* 2005;365(9460):663-70.

110. Azzopardi D, Brocklehurst P, Edwards D, Halliday H, Levene M, Thoresen M, et al. The TOBY Study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: a randomised controlled trial. *BMC Pediatr.* 2008;8:17.
111. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med.* 2005;353(15):1574-84.
112. Zhou W, Cheng G, Shao X, Liu X, Shan R, Zhuang D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a multicenter randomized controlled trial in China. *J Pediatr.* 2010;157(3):367-72, 372.e1-3.
113. Simbruner G, Mittal RA, Rohlmann F, Muche R, neo.nEURO.network Trial Participants. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of neo.nEURO.network RCT. *Pediatrics.* 2010;126(4):e771-778.
114. Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, Vohr BR, Hintz SR, Yolton K, et al. Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(22):2085-92.
115. Drury PP, Gunn ER, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Clin Perinatol.* 2014;41(1):161-75.
116. Shankaran S. Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol.* 2012;39(4):919-29.
117. Wang Q, Lv H, Lu L, Ren P, Li L. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: emerging therapeutic strategies based on pathophysiologic phases of the injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;1-8.
118. Perrone S, Szabó M, Bellieni CV, Longini M, Bangó M, Kelen D, et al. Whole body hypothermia and oxidative stress in babies with hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Neurol.* 2010;43(4):236-40.
119. Committee on Fetus and Newborn, Papile L-A, Baley JE, Benitz W, Cummings J, Carlo WA, et al. Hypothermia and neonatal encephalopathy. *Pediatrics.* 2014;133(6):1146-50.
120. Rodríguez-Fanjul J, Durán Fernández-Feijóo C, Lopez-Abad M, Lopez Ramos MG, Balada Caballé R, Alcántara-Horillo S, et al. Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: Is it a gender question? *PLoS ONE.* 2017;12(9):e0184643.

121. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006;58(1):87-114.
122. Boda D. Results of and further prevention of hypoxic fetal brain damage by inhibition of xanthine oxidase enzyme with allopurinol. *J Perinat Med.* 2011;39(4):441-4.
123. Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, Kops N, Blomgren K, Buonocore G, et al. Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 2003;54(4):516-22.
124. Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JM. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.* 1987;213(1):23-8.
125. Shadid M, Buonocore G, Groenendaal F, Moison R, Ferrali M, Berger HM, et al. Effect of deferoxamine and allopurinol on non-protein-bound iron concentrations in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett.* 1998;248(1):5-8.
126. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 1997;41(5):607-16.
127. L RA and R. Xanthine oxido-reductase, free radicals and cardiovascular disease. A critical review. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 11 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24127160>
128. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3527579.
129. Cantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 2013;1:353-8.
130. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol (Lond).* 2004;555(Pt 3):589-606.
131. Annink KV, Franz AR, Derks JB, Rudiger M, Bel F van, Benders MJNL. Allopurinol: Old Drug, New Indication in Neonates? *Curr Pharm Des.* 2017;23(38):5935-42.
132. Williams GD, Palmer C, Heitjan DF, Smith MB. Allopurinol preserves cerebral energy metabolism during perinatal hypoxia-ischemia: a <sup>31</sup>P NMR study in unanesthetized immature rats. *Neurosci Lett.* 1992;144(1-2):103-6.

133. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res.* 1990;27(4 Pt 1):332-6.
134. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res.* 1993;33(4 Pt 1):405-11.
135. Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res.* 2006;1073-1074:444-50.
136. Marro PJ, McGowan JE, Razdan B, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on uric acid levels and brain cell membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res.* 1994;650(1):9-15.
137. Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, Rademaker CMA, Bos AF, Van Den Berg P, et al. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics.* 2009;124(1):350-7.
138. Kaandorp JJ, Benders MJNL, Schuit E, Rademaker CMA, Oudijk MA, Porath MM, et al. Maternal allopurinol administration during suspected fetal hypoxia: a novel neuroprotective intervention? A multicentre randomised placebo controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015;100(3):F216-223.
139. Kaandorp JJ, van den Broek MPH, Benders MJNL, Oudijk MA, Porath MM, Bambang Oetomo S, et al. Rapid target allopurinol concentrations in the hypoxic fetus after maternal administration during labour. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014;99(2):F144-148.
140. Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, et al. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics.* 1998;101(2):185-93.
141. Benders MJNL, Bos AF, Rademaker CMA, Rijken M, Torrance HL, Groenendaal F, et al. Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006;91(3):F163-165.
142. Kaandorp JJ, van Bel F, Veen S, Derks JB, Groenendaal F, Rijken M, et al. Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: follow-up of two randomised controlled trials. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2012;97(3):F162-166.
143. Gunes T, Ozturk MA, Koklu E, Kose K, Gunes I. Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol.* 2007;36(1):17-24.



144. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(2):CD006817.
145. Yıldız EP, Ekici B, Tatlı B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. *Expert Rev Neurother*. 2017;17(5):449-59.
146. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002;129(2):505-16.
147. Mazur M, Miller RH, Robinson S. Postnatal erythropoietin treatment mitigates neural cell loss after systemic prenatal hypoxic-ischemic injury. *J Neurosurg Pediatr*. 2010;6(3):206-21.
148. Sargin D, Friedrichs H, El-Kordi A, Ehrenreich H. Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2010;24(4):573-94.
149. Xiong T, Qu Y, Mu D, Ferriero D. Erythropoietin for neonatal brain injury: opportunity and challenge. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29(6):583-91.
150. Wu Q, Chen W, Sinha B, Tu Y, Manning S, Thomas N, et al. Neuroprotective agents for neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Drug Discov Today*. 2015;20(11):1372-81.
151. Zhu C, Kang W, Xu F, Cheng X, Zhang Z, Jia L, et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 2009;124(2):e218-226.
152. Elmahdy H, El-Mashad A-R, El-Bahrawy H, El-Gohary T, El-Barbary A, Aly H. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics*. 2010;125(5):e1135-1142.
153. Wu YW, Mathur AM, Chang T, McKinstry RC, Mulkey SB, Mayock DE, et al. High-Dose Erythropoietin and Hypothermia for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Phase II Trial. *Pediatrics*. 2016;137(6).
154. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res*. 2008;44(2):157-64.
155. Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, Bainbridge A, Andorka C, Price D, et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain*. 2013;136(Pt 1):90-105.

156. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, Rowisha M, Awny M, El-Gohary T, et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *J Perinatol*. 2015;35(3):186-91.
157. Davidson JO, Dean JM, Fraser M, Wassink G, Andelius TC, Dhillon SK, et al. Perinatal brain injury: mechanisms and therapeutic approaches. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:2204-26.
158. Angehagen M, Rönnbäck L, Hansson E, Ben-Menachem E. Topiramate reduces AMPA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *J Neurochem*. 2005;94(4):1124-30.
159. Costa C, Martella G, Picconi B, Prosperetti C, Pisani A, Di Filippo M, et al. Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. *Stroke*. 2006;37(5):1319-26.
160. Zona C, Ciotti MT, Avoli M. Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett*. 1997;231(3):123-6.
161. Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia*. 2004;45(12):1478-87.
162. Noh M-R, Kim SK, Sun W, Park SK, Choi HC, Lim JH, et al. Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol*. 2006;201(2):470-8.
163. Filippi L, Fiorini P, Catarzi S, Berti E, Padriani L, Landucci E, et al. Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeoNATI): a feasibility study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018;31(8):973-80.
164. Muller AJ, Marks JD. Hypoxic ischemic brain injury: Potential therapeutic interventions for the future. *Neoreviews*. 2014;15(5):e177-86.
165. Hobbs C, Thoresen M, Tucker A, Aquilina K, Chakkarapani E, Dingley J. Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *Stroke*. 2008;39(4):1307-13.
166. Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, Hoque N, Aquilina K, Porter H, et al. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol*. 2010;68(3):330-41.



167. Dingley J, Tooley J, Liu X, Scull-Brown E, Elstad M, Chakkarapani E, et al. Xenon ventilation during therapeutic hypothermia in neonatal encephalopathy: a feasibility study. *Pediatrics*. 2014;133(5):809-18.
168. Azzopardi D, Robertson NJ, Bainbridge A, Cady E, Charles-Edwards G, Deierl A, et al. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(2):145-53.
169. Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis*. 2010;37(2):434-40.
170. Lafuente H, Pazos MR, Alvarez A, Mohammed N, Santos M, Arizti M, et al. Effects of Cannabidiol and Hypothermia on Short-Term Brain Damage in New-Born Piglets after Acute Hypoxia-Ischemia. *Front Neurosci*. 2016;10:323.
171. Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, Santos M, Martínez-Pinilla E, Moreno E, et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology*. 2013;71:282-91.
172. Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, Alvarez A, Rey-Santano MC, Mielgo V, et al. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res*. 2011;70(3):272-7.
173. Lafuente H, Pazos MR, Alvarez A, Mohammed N, Santos M, Arizti M, et al. Effects of Cannabidiol and Hypothermia on Short-Term Brain Damage in New-Born Piglets after Acute Hypoxia-Ischemia. *Front Neurosci* [Internet]. 12 de julio de 2016 [citado 21 de marzo de 2019];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940392/>
174. Diamandis T, Borlongan CV. One, Two, Three STEPS Towards Cell Therapy for Stroke. *Stroke*. 2015;46(2):588-91.
175. Borlongan CV, Weiss MD. Baby STEPS: a giant leap for cell therapy in neonatal brain injury. *Pediatr Res*. 2011;70(1):3-9.
176. Drobyshevsky A, Cotten CM, Shi Z, Luo K, Jiang R, Derrick M, et al. Human Umbilical Cord Blood Cells Ameliorate Motor Deficits in Rabbits in a Cerebral Palsy Model. *Dev Neurosci*. 2015;37(4-5):349-62.

177. Park WS, Sung SI, Ahn SY, Yoo HS, Sung DK, Im GH, et al. Hypothermia augments neuroprotective activity of mesenchymal stem cells for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0120893.
178. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of Autologous Cord Blood Cells for Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2014;164(5):973-979.e1.
179. Martínez-Orgado J, Fernández-Frutos B, González R, Romero E, Urigüen L, Romero J, et al. Neuroprotection by the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vivo newborn rat model of acute severe asphyxia. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;114(2):132-9.
180. Rodríguez-Fanjul J, Fernández-Feijóo CD, Camprubí MC. A New Technique for Collection of Cerebrospinal Fluid in Rat Pups. *J Exp Neurosci*. 2015;9:37-41.
181. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-7.
182. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.
183. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*. 1980;106(1):207-12.
184. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*. 1990;186:464-78.
185. Ferriero DM, Ferreiro DM. Can we define the pathogenesis of human periventricular white-matter injury using animal models? *J Child Neurol*. 2006;21(7):580-1.
186. Hagberg H, Ichord R, Palmer C, Yager JY, Vannucci SJ. Animal models of developmental brain injury: relevance to human disease. A summary of the panel discussion from the Third Hershey Conference on Developmental Cerebral Blood Flow and Metabolism. *Dev Neurosci*. 2002;24(5):364-6.
187. Huang L, Zhao F, Qu Y, Zhang L, Wang Y, Mu D. Animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy: optimal choices for the best outcomes. *Rev Neurosci*. 2017;28(1):31-43.
188. Northington FJ. Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR J*. 2006;47(1):32-8.

189. Alexander M, Garbus H, Smith AL, Rosenkrantz TS, Fitch RH. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behav Brain Res.* 2014;259:85-96.
190. Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res.* 2003;973(2):171-8.
191. Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 2000;859(2):318-25.
192. Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res.* 2005;157(1):157-65.
193. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci.* 2005;27(2-4):81-6.
194. Rumajogee P, Bregman T, Miller SP, Yager JY, Fehlings MG. Rodent Hypoxia-Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review. *Front Neurol.* 2016;7:57.
195. Wang Y, Cheung P-T, Shen GX, Wu EX, Cao G, Bart I, et al. Hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat model: relationship between lesion size at early MR imaging and irreversible infarction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2006;27(1):51-4.
196. Liu Y, Silverstein FS, Skoff R, Barks JDE. Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res.* 2002;51(1):25-33.
197. Ness JK, Romanko MJ, Rothstein RP, Wood TL, Levison SW. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. *Dev Neurosci.* 2001;23(3):203-8.
198. Weis SN, Schunck RVA, Pettenuzzo LF, Krolow R, Matté C, Manfredini V, et al. Early biochemical effects after unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(2):115-20.
199. Towfighi J, Yager JY, Housman C, Vannucci RC. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol.* 1991;81(5):578-87.
200. Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, Nagai H, Ohmae T, Hasegawa K, et al. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Res.* 1999;837(1-2):213-20.

201. Cai Z, Pang Y, Xiao F, Rhodes PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 2001;898(1):126-35.
202. Larphaveesarp A, Gonzalez FF. Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Neonatal Stroke in P10 Rats. *J Vis Exp.* 2017;(122).
203. Derugin N, Ferriero DM, Vexler ZS. Neonatal reversible focal cerebral ischemia: a new model. *Neurosci Res.* 1998;32(4):349-53.
204. Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke.* 1998;29(7):1454-60; discussion 1461.
205. Dingley J, Tooley J, Porter H, Thoresen M. Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia. *Stroke.* 2006;37(2):501-6.
206. Yuan X, Ghosh N, McFadden B, Tone B, Bellinger DL, Obenaus A, et al. Hypothermia modulates cytokine responses after neonatal rat hypoxic-ischemic injury and reduces brain damage. *ASN Neuro.* 2014;6(6).
207. Gonzalez-Rodriguez PJ, Xiong F, Li Y, Zhou J, Zhang L. Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: role of glucocorticoid receptors. *Neurobiol Dis.* 2014;65:172-9.
208. Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(10):1090-7.
209. Recker R, Adami A, Tone B, Tian HR, Lalas S, Hartman RE, et al. Rodent neonatal bilateral carotid artery occlusion with hypoxia mimics human hypoxic-ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(7):1305-16.
210. Edwards AB, Feindel KW, Cross JL, Anderton RS, Clark VW, Knuckey NW, et al. Modification to the Rice-Vannucci perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy model in the P7 rat improves the reliability of cerebral infarct development after 48hours. *J Neurosci Methods.* 2017;288:62-71.
211. Lee BS, Woo C-W, Kim S-T, Kim K-S. Long-term neuroprotective effect of postischemic hypothermia in a neonatal rat model of severe hypoxic ischemic encephalopathy: a comparative study on the duration and depth of hypothermia. *Pediatr Res.* 2010;68(4):303-8.
212. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation.* 2014;85(4):567-72.

213. Yager J, Towfighi J, Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res*. 1993;34(4):525-9.
214. Sheldon RA, Chuai J, Ferriero DM. A rat model for hypoxic-ischemic brain damage in very premature infants. *Biol Neonate*. 1996;69(5):327-41.
215. Brochu M-E, Girard S, Lavoie K, Sébire G. Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. *J Neuroinflammation*. 2011;8:55.
216. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation*. 2014;85(4):567-72.
217. Sabir H, Walløe L, Dingley J, Smit E, Liu X, Thoresen M. Combined Treatment of Xenon and Hypothermia in Newborn Rats - Additive or Synergistic Effect? *PLoS One* [Internet]. 6 de octubre de 2014 [citado 7 de abril de 2019];9(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4186877/>
218. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*. 2001;105(1):7-17.
219. Tucker AM, Aquilina K, Chakkarapani E, Hobbs CE, Thoresen M. Development of amplitude-integrated electroencephalography and interburst interval in the rat. *Pediatr Res*. 2009;65(1):62-6.
220. Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev*. 1991;26(1):61-7.
221. Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC, Vannucci SJ. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997;100(2):149-60.
222. Charriaut-Marlangue C, Baud O. A Model of Perinatal Ischemic Stroke in the Rat: 20 Years Already and What Lessons? *Front Neurol*. 2018;9:650.
223. Mitsufuji N, Yoshioka H, Okano S, Nishiki T, Sawada T. A new model of transient cerebral ischemia in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16(2):237-43.
224. Ashwal S, Tone B, Tian HR, Chong S, Obenaus A. Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging. *Pediatr Res*. 2007;61(1):9-14.

225. Mishima K, Ikeda T, Yoshikawa T, Aoo N, Egashira N, Xia YX, et al. Effects of hypothermia and hyperthermia on attentional and spatial learning deficits following neonatal hypoxia-ischemic insult in rats. *Behav Brain Res.* 2004;151(1-2):209-17.
226. Trescher WH, Ishiwa S, Johnston MV. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain Dev.* 1997;19(5):326-38.
227. Yager J, Towfighi J, Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res.* 1993;34(4):525-9.
228. Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH, Williams CE, Gluckman PD. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest.* 1997;99(2):248-56.
229. Gunn AJ, Gunn TR, Gunning MI, Williams CE, Gluckman PD. Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics.* 1998;102(5):1098-106.
230. Agnew DM, Koehler RC, Guerguerian A-M, Shaffner DH, Traystman RJ, Martin LJ, et al. Hypothermia for 24 hours after asphyxic cardiac arrest in piglets provides striatal neuroprotection that is sustained 10 days after rewarming. *Pediatr Res.* 2003;54(2):253-62.
231. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Cady EB, Wylezinska M, Kirkbride V, et al. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res.* 1995;37(5):667-70.
232. Perlman JM. Summary Proceedings From the Neurology Group on Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics.* 2006;117(Supplement 1):S28-33.
233. Shankaran S, Laptook AR, Pappas A, McDonald SA, Das A, Tyson JE, et al. Effect of Depth and Duration of Cooling on Death or Disability at Age 18 Months Among Neonates With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017;318(1):57-67.
234. Alonso-Alconada D, Broad KD, Bainbridge A, Chandrasekaran M, Faulkner SD, Kerenyi Á, et al. Brain cell death is reduced with cooling by 3.5°C to 5°C but increased with cooling by 8.5°C in a piglet asphyxia model. *Stroke.* 2015;46(1):275-8.
235. Davidson JO, Wassink G, Yuill CA, Zhang FG, Bennet L, Gunn AJ. How long is too long for cerebral cooling after ischemia in fetal sheep? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(5):751-8.



236. Wood T, Osredkar D, Puchades M, Maes E, Falck M, Flatebø T, et al. Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Sci Rep* [Internet]. 21 de marzo de 2016 [citado 10 de abril de 2019];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4800445/>
237. Gunn AJ, Thoresen M. Hypothermic neuroprotection. *NeuroRx*. 2006;3(2):154-69.
238. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999;55(2):158-63.
239. Laptook AR, Shankaran S, Tyson JE, Munoz B, Bell EF, Goldberg RN, et al. Effect of Therapeutic Hypothermia Initiated After 6 Hours of Age on Death or Disability Among Newborns With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;318(16):1550-60.
240. Arteaga O, Álvarez A, Revuelta M, Santaolalla F, Urtasun A, Hilario E. Role of Antioxidants in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury: New Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).
241. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(7):CD006817.
242. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(7):CD006817.
243. Itoh T, Kawakami M, Yamauchi Y, Shimizu S, Nakamura M. Effect of allopurinol on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 1986;17(6):1284-7.
244. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res*. 2010;44(7):711-20.
245. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*. 1998;44(6 Pt 1):1309-15.
246. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic Res*. 2015;49(5):633-49.
247. Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(2):931-4.
248. Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(4):503-15.

249. Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids*. 2012;165(6):638-47.
250. Dai C, Liu Y, Dong Z. Tanshinone I alleviates motor and cognitive impairments via suppressing oxidative stress in the neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Brain*. 2017;10(1):52.
251. Zhao P, Zhou R, Li H-N, Yao W-X, Qiao H-Q, Wang S-J, et al. Oxymatrine attenuated hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via improving antioxidant enzyme activities and inhibiting cell death. *Neurochem Int*. 2015;89:17-27.
252. Wei W, Lan X-B, Liu N, Yang J-M, Du J, Ma L, et al. Echinacoside Alleviates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rat by Enhancing Antioxidant Capacity and Inhibiting Apoptosis. *Neurochem Res*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02782-9>
253. Li L, Yang R, Li P, Lu H, Hao J, Li L, et al. Combination Treatment with Methylene Blue and Hypothermia in Global Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol*. 2018;55(3):2042-55.
254. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 2003;333(1):19-39.
255. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6501046.
256. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol*. 2004;207(Pt 18):3221-31.
257. Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, García-Sala F, Viña J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr*. 2003;142(3):240-6.
258. Vento M, Asensi M, Sastre J, García-Sala F, Pallardó FV, Viña J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics*. 2001;107(4):642-7.
259. Martin LJ, Brambrink AM, Price AC, Kaiser A, Agnew DM, Ichord RN, et al. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. *Neurobiol Dis*. 2000;7(3):169-91.
260. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):207-18.
261. Breusing N, Grune T. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view. *Exp Gerontol*. 2010;45(10):733-7.



262. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):23-38.
263. Sureda A, Batle JM, Tauler P, Aguiló A, Cases N, Tur JA, et al. Hypoxia/reoxygenation and vitamin C intake influence NO synthesis and antioxidant defenses of neutrophils. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(11):1744-55.
264. Mueller-Burke D, Koehler RC, Martin LJ. Rapid NMDA receptor phosphorylation and oxidative stress precede striatal neurodegeneration after hypoxic ischemia in newborn piglets and are attenuated with hypothermia. *Int J Dev Neurosci*. 2008;26(1):67-76.
265. Marzocchi B, Perrone S, Paffetti P, Magi B, Bini L, Tani C, et al. Nonprotein-bound iron and plasma protein oxidative stress at birth. *Pediatr Res*. 2005;58(6):1295-9.
266. Barata L, Arruza L, Rodríguez M-J, Aleo E, Vierge E, Criado E, et al. Neuroprotection by cannabidiol and hypothermia in a piglet model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2019;146:1-11.
267. Li L, Yang R, Li P, Lu H, Hao J, Li L, et al. Combination Treatment with Methylene Blue and Hypothermia in Global Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol*. 2018;55(3):2042-55.
268. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
269. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*. 2004;18(15):1791-800.
270. Signorini C, Ciccoli L, Leoncini S, Carloni S, Perrone S, Comporti M, et al. Free iron, total F-isoprostanes and total F-neuroprostanes in a model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: neuroprotective effect of melatonin. *J Pineal Res*. 2009;46(2):148-54.
271. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(4):505-13.
272. Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(5):724-32.
273. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2005;38(6):698-710.

274. Milne GL, Sanchez SC, Musiek ES, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Nat Protoc.* 2007;2(1):221-6.
275. Chafer-Pericas C, Cernada M, Rahkonen L, Stefanovic V, Andersson S, Vento M. Preliminary case control study to establish the correlation between novel peroxidation biomarkers in cord serum and the severity of hypoxic ischemic encephalopathy. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:244-9.
276. Negro S, Benders MJNL, Tataranno ML, Coviello C, de Vries LS, van Bel F, et al. Early Prediction of Hypoxic-Ischemic Brain Injury by a New Panel of Biomarkers in a Population of Term Newborns. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7608108.
277. Huun MU, Garberg HT, Escobar J, Chafer C, Vento M, Holme IM, et al. DHA reduces oxidative stress following hypoxia-ischemia in newborn piglets: a study of lipid peroxidation products in urine and plasma. *J Perinat Med.* 2018;46(2):209-17.
278. He YY, Hsu CY, Ezrin AM, Miller MS. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 2):H252-256.
279. Dirnagl U, Lindauer U, Them A, Schreiber S, Pfister HW, Koedel U, et al. Global cerebral ischemia in the rat: online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15(6):929-40.
280. Ono T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, et al. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 2009;1305:158-67.
281. Betz AL. Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J Neurochem.* 1985;44(2):574-9.
282. Gong P, Li C-S, Hua R, Zhao H, Tang Z-R, Mei X, et al. Mild Hypothermia Attenuates Mitochondrial Oxidative Stress by Protecting Respiratory Enzymes and Upregulating MnSOD in a Pig Model of Cardiac Arrest. *PLoS One* [Internet]. 20 de abril de 2012 [citado 23 de abril de 2019];7(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3332059/>
283. Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, Guo Q. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke.* 1994;25(1):147-52.
284. Kuo J-R, Lo C-J, Chang C-P, Lin M-T, Chio C-C. Attenuation of brain nitrostatic and oxidative damage by brain cooling during experimental traumatic brain injury. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:145214.

285. Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015;100(6):F541-52.
286. Camara AKS, Riess ML, Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Hypothermia augments reactive oxygen species detected in the guinea pig isolated perfused heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(4):H1289-1299.
287. Toader A-M, Filip A, Decea N, Muresan A. Neuroprotective strategy in an experimental newborn rat model of brain ischemia and hypoxia: effects of Resveratrol and hypothermia. *Clujul Med.* 2013;86(3):203-7.
288. Cerebrospinal fluid: Physiology and utility of an examination in disease states - UpToDate [Internet]. [citado 15 de abril de 2019]. Disponible en: [https://www.uptodate.com.mergullador.sergas.es/contents/cerebrospinal-fluid-physiology-and-utility-of-an-examination-in-disease-states?search=Cerebrospinal%20fluid:%20physiology%20and%20utility%20of%20an%20examination%20in%20disease%20states%20Up%20to%20date&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com.mergullador.sergas.es/contents/cerebrospinal-fluid-physiology-and-utility-of-an-examination-in-disease-states?search=Cerebrospinal%20fluid:%20physiology%20and%20utility%20of%20an%20examination%20in%20disease%20states%20Up%20to%20date&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
289. Kumar A, Mittal R, Khanna HD, Basu S. Free radical injury and blood-brain barrier permeability in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics.* 2008;122(3):e722-727.
290. Anagnostakis D, Messaritakis J, Damianos D, Mandyla H. Blood-brain barrier permeability in «healthy» infected and stressed neonates. *J Pediatr.* 1992;121(2):291-4.
291. Korn A, Golan H, Melamed I, Pascual-Marqui R, Friedman A. Focal cortical dysfunction and blood-brain barrier disruption in patients with Postconcussion syndrome. *J Clin Neurophysiol.* 2005;22(1):1-9.
292. Jiang JY, Lyeth BG, Kapasi MZ, Jenkins LW, Povlishock JT. Moderate hypothermia reduces blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury in the rat. *Acta Neuropathol.* 1992;84(5):495-500.
293. Lotocki G, de Rivero Vaccari JP, Perez ER, Sanchez-Molano J, Furones-Alonso O, Bramlett HM, et al. Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *J Neurotrauma.* 2009;26(7):1123-34.
294. Li J, Li C, Yuan W, Wu J, Li J, Li Z, et al. Mild hypothermia alleviates brain oedema and blood-brain barrier disruption by attenuating tight junction and adherens junction breakdown in a swine model of cardiopulmonary resuscitation. *PLoS ONE.* 2017;12(3):e0174596.

295. Lee JE, Yoon YJ, Moseley ME, Yenari MA. Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J Neurosurg.* 2005;103(2):289-97.
296. Nagel S, Su Y, Horstmann S, Heiland S, Gardner H, Koziol J, et al. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res.* 2008;1188:198-206.
297. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):267-78.
298. Baumann E, Preston E, Slinn J, Stanimirovic D. Post-ischemic hypothermia attenuates loss of the vascular basement membrane proteins, agrin and SPARC, and the blood-brain barrier disruption after global cerebral ischemia. *Brain Res.* 2009;1269:185-97.
299. Jin J, Sakaeda T, Kakumoto M, Nishiguchi K, Nakamura T, Okamura N, et al. Effect of therapeutic moderate hypothermia on multi-drug resistance protein 1-mediated transepithelial transport of drugs. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2006;46(7):321-7; discussion 327.
300. Alataş O, Sahin A, Colak O, Inal M, Köken T, Yaşar B, et al. Beneficial effects of allopurinol on glutathione levels and glutathione peroxidase activity in rat ischaemic acute renal failure. *J Int Med Res.* 1996;24(1):33-9.
301. Sinik Z, Turan T, Demir S, Yilmaz U, Sert S, Aybek Z. The effect of partial unilateral ureteral obstruction release and allopurinol on the renal malondialdehyde and glutathione levels. *Int J Urol.* 2005;12(11):990-3.
302. Jenkinson SG, Roberts RJ, DeLemos RA, Lawrence RA, Coalson JJ, King RJ, et al. Allopurinol-induced effects in premature baboons with respiratory distress syndrome. *J Appl Physiol.* 1991;70(3):1160-7.
303. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res.* 2000;28(2):89-96.
304. Alva N, Palomeque J, Carbonell T. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:957054.
305. Zhao H, Chen Y. Effects of mild hypothermia therapy on the levels of glutathione in rabbit blood and cerebrospinal fluid after cardiopulmonary resuscitation. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(2):194-8.

306. Hackenhaar FS, Medeiros TM, Heemann FM, Behling CS, Mahl CD, Verona C, et al. Mild Therapeutic Hypothermia Increases Glutathione Levels in Postcardiac Arrest Patients. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2019;9(1):63-9.
307. Zhang H, Zhang J, Mei Y, Sun S, Tong E -tang. Effects of immediate and delayed mild hypothermia on endogenous antioxidant enzymes and energy metabolites following global cerebral ischemia. *Chin Med J.* 2011;124(17):2764-6.
308. Ni X, Yang Z-J, Carter EL, Martin LJ, Koehler RC. Striatal neuroprotection from neonatal hypoxia-ischemia in piglets by antioxidant treatment with EUK-134 or edaravone. *Dev Neurosci.* 2011;33(3-4):299-311.
309. Perrone S, Tataranno ML, Stazzoni G, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in fetal and neonatal diseases. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(12):2575-8.
310. Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli L, Bracci R. Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr Res.* 2000;47(2):221-4.
311. Buonocore G, Perrone S, Longini M, Vezzosi P, Marzocchi B, Paffetti P, et al. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr Res.* 2002;52(1):46-9.
312. Yamaguchi M, Okamoto K, Kusano T, Matsuda Y, Suzuki G, Fuse A, et al. The Effects of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors on Oxidative Stress Markers following Global Brain Ischemia Reperfusion Injury in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE.* 2015;10(7):e0133980.
313. Garberg HT, Huun MU, Escobar J, Martinez-Orgado J, Løberg E-M, Solberg R, et al. Short-term effects of cannabidiol after global hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Pediatr Res.* 2016;80(5):710-8.
314. Duncan JG, Ravi R, Stull LB, Murphy AM. Chronic xanthine oxidase inhibition prevents myofibrillar protein oxidation and preserves cardiac function in a transgenic mouse model of cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(4):H1512-1518.
315. Ischiropoulos H, al-Mehdi AB, Fisher AB. Reactive species in ischemic rat lung injury: contribution of peroxynitrite. *Am J Physiol.* 1995;269(2 Pt 1):L158-164.
316. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49(3):481-93.

317. Dorrepaal CA, Berger HM, Benders MJ, van Zoeren-Grobbe D, Van de Bor M, Van Bel F. Nonprotein-bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn. *Pediatrics*. 1996;98(5):883-9.
318. Kumar A, Ramakrishna SVK, Basu S, Rao GRK. Oxidative stress in perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol*. 2008;38(3):181-5.
319. Schmidt H, Grune T, Müller R, Siems WG, Wauer RR. Increased levels of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia. *Pediatr Res*. 1996;40(1):15-20.
320. George J, Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5(1):265-72.
321. Dede S, Deger Y, Meral I. Effect of short-term hypothermia on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2002;49(6):286-8.
322. Hasegawa M, Ogihara T, Tamai H, Hiroi M. Hypothermic inhibition of apoptotic pathways for combined neurotoxicity of iron and ascorbic acid in differentiated PC12 cells: reduction of oxidative stress and maintenance of the glutathione redox state. *Brain Res*. 2009;1283:1-13.
323. Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2002;11(1):28-42.
324. Huun MU, Garberg HT, Buonocore G, Longini M, Belvisi E, Bazzini F, et al. Regional differences of hypothermia on oxidative stress following hypoxia-ischemia: a study of DHA and hypothermia on brain lipid peroxidation in newborn piglets. *J Perinat Med*. 2018;47(1):82-9.
325. Zhang H, Zhou M, Zhang J, Mei Y, Sun S, Tong E. Initiation time of post-ischemic hypothermia on the therapeutic effect in cerebral ischemic injury. *Neurol Res*. 2009;31(4):336-9.



# 8

## **Anexos**

---





## ANEXO 1. INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA



UNIVERSITAT DE BARCELONA



C.E.E.A.  
(Comitè Ètic d'Experimentació Animal)

Centres Científics i Tecnològics  
Edifici Florensa, C/Adolf Florensa n°8, 1ª planta, despatx F14  
08028 Barcelona  
Telf. 934 034 786  
ceea@ccit.ub.edu

### COMITÈ ÈTIC D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL (CEEA)

#### Formulari d'acceptació de procediments

#### DADES PROCEDIMENT

**Títol:** Neuroprotecció mitjançant teràpia combinada ( Hipotèrmia + Alopurinol ) en un model animal de dany cerebral hipòxic-isquèmic, en cries de rata wistar

Investigador Responsable: **Marta Camprubí Camprubí**

Un cop examinada la documentació presentada, en compliment del Decret 214/97 de la Generalitat de Catalunya, el CEEA de la UB ha resolt **ACCEPTAR** el procediment sol·licitat.

Signat pels membres del CEEA que han pres l'acord

Barcelona, 10 de març del 2016

NOTA: El CEEA delega en el/la responsable en benestar animal de la Unitat d'Experimentació Animal on s'allotjaran els animals, el seguiment de la realització del procediment d'acord amb el que està establert a la memòria aprovada per aquest comitè.

REGISTRAR	
Comitè Ètic d'Experimentació Animal	
Data:	08 ABR. 2016
Paratja:	—
Serietat:	266/16



